

Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie
Direktor: Prof. Dr. med. M. Stöckle
Experimentelle Urologie des Universitätsklinikums des
Saarlandes in Homburg

EXPRESSION DES MUZINS MUC 7

IM NIERENGeweBE

Dissertation zur Erlangung der
Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes in Homburg

vorgelegt
von
Roushanak Shayesteh-Kheslat
aus Teheran

Homburg 2006

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt, Homburg, den

gez.

| Inhaltsverzeichnis | Seite |
|---|--------------|
| Abkürzungen | 6-7 |
| I. Zusammenfassung in Englisch | 8-9 |
| II. Zusammenfassung in Deutsch | 9-10 |
| | |
| 1. Einleitung | 10 |
| | |
| 1.1. Definition Muzine und ihr Vorkommen | 10-12 |
| 1.2. Chemische Eigenschaften der Muzine | 13-14 |
| 1.2.1. MG1 und MG2 | 14-16 |
| 1.2.2. Rekombinantes Protein des Muc7 und seine Eigenschaften | 17 |
| 1.2.3. Isoformen des MG2-Proteins | 17 |
| 1.3. Bedeutung der Muzine im Harntrakt | 17-18 |
| 1.4. Chronische Pyelonephritis | 18-19 |
| 1.4.1. Diagnostik der Pyelonephritis | 19 |
| 1.4.2. Therapie der Pyelonephritis | 19 |
| 1.5. Fragestellung der vorliegenden Arbeit | 19-20 |
| | |
| 2. Material und Methoden | 21 |
| | |
| 2.1. Verwendete Chemikalien und Geräte | 21 |
| 2.1.1. Materialien für die Zellkultur | 21 |
| 2.1.2. Materialien für die Gewebe – Extraktion | 22 |
| 2.1.3. Materialien für die Überprüfung der RNA- Integrität | 22 |
| 2.1.4. Materialien für die Polymerase – Kettenreaktion | 23 |
| 2.1.5. Pufferlösungen und Agarosegele | 24 |
| 2.1.6. Immunhistochemie | 25 |
| 2.1.6.A Reagenzien für Immunhistochemie | 25 |
| 2.1.6.B Geräte für Immunhistochemie | 25 |
| 2.1.6.C Antikörper für die Immunhistochemie | 26 |
| 2.1.7. Nierengewebe | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 2.1.8. Gewebeproben | 26-27 |
| 2.1.9. Probanden für Sammelurin | 27-28 |
| 2.1.10. Zelllinie | 29 |
| 2.1.11. Kultivierung der Zellkulturen | 29 |
| 2.1.12. Erstellen von neuen Zellpassagen | 29 |
| 2.2. Durchgeführte Untersuchungen | 30 |
| 2.2.1. RNA- Extraktion | 30-31 |
| 2.2.2. RNA- Extraktion aus Paraffingewebe | 31-32 |
| 2.2.3. Verarbeitung des Sammelurins | 32 |
| 2.2.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA | 33 |
| 2.3. Polymerase- Ketten- Reaktion | 33-34 |
| 2.3.1. Reverse-Transkriptase-Vorbereitung | 34-35 |
| 2.3.2. Mischung für die Herstellung der externen PCR | 35-36 |
| 2.3.3. Herstellung der internen PCR | 36-37 |
| 2.4. Durchführung der Muc7 spezifischen nested PCR | 37 |
| 2.4.1. GAPDH- Lösung | 38 |
| 2.5. Darstellung der PCR-Lösung | 38-39 |
| 2.6. Sequenzierung der PCR- Produkte | 39 |
| 2.7. Immunhistochemie | 39-40 |
| 2.7.1. Erstellung von Paraffinschnitten | 40 |
| 2.7.2. Das Prinzip der Immunhistochemie | 40-41 |
| 2.7.3. Vorbehandlung der Paraffinschnitte | 41-42 |
| 2.7.4. Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern | 42 |
| 2.7.5. Indikatorreaktion | 42 |
| 2.7.6. Kernfärbung | 43 |
| 2.7.7. Kontrollen für die Immunhistochemie | 43 |
| 2.7.8. Auswertung der immunhistochemischen Färbungen | 43-44 |
| 2.8. Statistische Auswertung | 44 |

| | |
|---|-------|
| 3. Ergebnisse | 45 |
| 3.1. GAPDH- RT- PCR | 45 |
| 3.2. Kontrollen | 45 |
| 3.3. Muc7-Genexpression in normalem Nierengewebe | 45-46 |
| 3.4. Muc7-Genexpression in chronisch entzündetem Nierengewebe (Frischgewebe) | 46-47 |
| 3.5. Ergebnisse der Sammelurinproben | 47 |
| 3.5.1. Muc7-Genexpression in Sammelurinproben von Patienten mit Harnwegsinfekt | 47 |
| 3.5.2. Muc7-Genexpression in Sammelurinproben von gesunden Probanden | 48-50 |
| 3.6. Immunlokalisation von Muc7 (MG2) in Nierengeweben | 51-53 |
| 4. Diskussion | 54 |
| 5. Literaturverzeichnis | 57-61 |
| 6. Danksagung | 62 |
| 7. Lebenslauf | 63-64 |

Abkürzungen

| | |
|----------|--|
| Abb. | Abbildung |
| BCG | Bacillus Calmette-Guerin |
| Bp | Basenpaare |
| Da | Dalton |
| DB Nr | Datenbank- Nummer |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| cDNA | Copy- Desoxyribonukleinsäure |
| Cystein | 2'-Amino-3- Mercaptopropion Säure |
| dATP | 2'-Desoxyadenosintriphosphat |
| dCTP | 2'-Desoxycytidintriphosphat |
| dGTP | 2'-Desoxyguanosintriphosphat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | 2'-Desoxyribonukleotid-5'-Phosphat |
| dTTP | 2'-Desoxythymidintriphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| Fa | Firma |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| kb | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilo- Dalton |
| Lfd. Nr. | Laufende Nummer |
| μ | Mikro |
| m | Milli |
| M | Molar |
| MA | Milli- Ampere |
| mRNA | messenger Ribonukleinsäure |
| MG1 | Mucoglykoprotein 1 |
| MG2 | Mucoglykoprotein 2 |
| Muc | Mucin |
| ng | Nanogramm |
| NTX | Nierentransplantation |

| | |
|----------|-----------------------------------|
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerase-Chain-Reaction |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNA-zol | Acid-phenol-guanidium-thiocyanate |
| rpm | rotations per minute |
| RT | Reverse Transkription |
| Serin | 2-Amino-3 Hydroxypropionsäure |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| Taq | Termophilus aquaticus |
| TE | Tris-EDTA |
| Threonin | 2-Amino-3-hydroxy-butan-1-säure |
| Tris | Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan |
| U | Unit |
| UV | Ultraviolettes Licht |
| V | Volt |
| W | Watt |

1. Zusammenfassung

I. Expression of Mucin Muc7 in kidneys with chronic pyelonephritis

MG2 is a high molecular weight glycoprotein with a molecular mass of 150–200 kDa. It contains 30% protein (357 aminoacids), 68% carbohydrates, 1.6% sulfate and 0.4% calcium. MG2 apomucin has been cloned from a human submandibular gland cDNA library, and the gene encoding this mucin has been named Muc7. Muc7 has been studied extensively in malignant transformation of various human tissues. However, it seems that some mucins such as Muc7 play a role in infectious host defense by binding and eliminating bacteria from mucous epithelial surfaces via IgA and causing a complex reaction with bacteria. In regard to infection Muc7 has been first described and investigated in the oral cavity as its expression is found in salivary glands. We have investigated the gene- and protein-expression of mucin Muc7 in kidney specimens with chronic pyelonephritis that had been surgically excised from patients, and compared it to normal kidney tissue samples from tumor bearing organs. Furthermore, we investigated the Muc7 gene expression in voided urine samples from patients with acute pyelonephritis.

We extracted RNA from 15 tissue specimens of chronic pyelonephritic kidneys and 10 tissue samples from normal sections of tumor bearing kidneys. In order to increase the sample size we attempted to extract RNA also from paraffin embedded tissues. A Muc7 specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was applied to the samples to detect Muc7 gene-expression. Additionally, we investigated the protein expression of Mucin Muc7 by immunohistochemistry using a monoclonal antibody which was applied to sections of paraffin embedded tissues. We found Muc7 gene expression in 7 of 15 and protein-expression in 6 out of 15 samples of kidneys with chronic pyelonephritic alterations. In contrast, none of ten normal renal tissue samples displayed any Muc7 gene- or protein-expression (Fisher's exact test each $p < 0.05$).

We also investigated the gene-expression of Muc7 by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in voided urine specimens from 15 patients with acute pyelonephritis compared to 15 healthy volunteers. Muc7 gene-expression was detected in 5 of 15 voided urine samples of patients with pyelonephritis and also in 2 samples from 15 healthy volunteers (Fisher's exact test $p=0.39$).

We conclude from our observation that in pyelonephritic kidneys upregulation of Muc7 can be frequently found which is potentially involved in a combat against infectious organisms.

II. Expression von Mucin Muc7 in entzündetem Nierengewebe

Das Glykoprotein MG2 hat ein Molekulargewicht zwischen 150-200 kD und besteht aus 68% Kohlenhydraten, 30% Protein (357 Aminosäuren), 1,6% Sulfat und 0,4% Kalzium. Das MG2-Apomycin ist das Produkt des Muc7-Gens, das erstmals aus der cDNA einer humanen Glandula submandibularis kloniert wurde. Die Expression verschiedener Glykoproteine u.a. des MG2 konnte im Bereich diverser epithelialer Gewebe des menschlichen Körpers nachgewiesen werden. Es wird davon ausgegangen, dass MG2 in Zusammenhang mit dem lokalen Abwehrsystem auf Schleimhäuten, z.B. durch Komplexbindung mit IgA gegen Bakterien eine wichtige Rolle spielt. Dazu gibt es verschiedene Untersuchungen im Bereich der oralen Speicheldrüsen (BIESBROCK et al. 1991; GROENINK et al. 1996). Wir haben die Induktion und die Gen-Expression von Muc7 in operativ gewonnenem entzündlich veränderten Nierengewebe im Vergleich zu Normalgewebeproben nach chirurgischer Entfernung tumortragender Organe untersucht.

Insgesamt wurde aus 15 entzündlich veränderten und aus 10 gesunden frischen Nierengewebeproben RNA extrahiert und mittels Polymerase- Ketten- Reaktion der Nachweis von Muc7 vorgenommen. Wir fanden eine positive Induktion der Genexpression in 7 von 15 der pyelonephritisch veränderten Gewebe im Vergleich zu einer nicht nachweisbaren Expression im gesunden Nierengewebe von 10 Proben. Ergänzend dazu wurde an Paraffinfixiertem entzündlich veränderten Geweben immunhistochemisch eine Proteinexpression von Muc7 in 6 von 15 Proben nachgewiesen, nicht aber an den 10 normalen Gewebeproben.

Im letzten Abschnitt dieser Arbeit wurde zusätzlich mittels RT-PCR die Muc7-Genexpression im Urin von 15 Patienten mit Nierenbeckenentzündung und 15 gesunden Freiwilligen als Kontrollgruppe untersucht. Die RNA-Extraktion erfolgte aus abgeschilferten Zellen, die aus 100-500 ml Urin gewonnen wurden. Sowohl bei 5 von 15 Patienten mit Pyelonephritis als auch in 2 von 15 gesunden Kontrollpersonen fand sich eine positive Muc7 Expression (Fisher Test $p=0,39$). Unsere Untersuchung konnte nachweisen, dass entzündliche Veränderungen im Nierenparenchym eine Hochregulierung der Muc7 Gen- und Protein-Expression bedingen. Muc7 spielt dabei möglicherweise eine Rolle in der angeborenen Immunabwehr gegen bakterielle Entzündungserreger im Harntrakt.

1. Einleitung

1.1. Definition Muzine und ihr Vorkommen

In der Literatur ist eine Expression von hochmolekularen Muzinen aus Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes, der Atemwege und des Urogenitaltraktes beschrieben (LIU et al. 2000). Diese können in Verbindung mit Immunglobulinen IgA gegenüber Bakterien in Interaktion treten und eine antibakterielle bzw. organprotektive Aufgabe erfüllen (MURRAY et al. 1992; HOFFMAN and HAIDARIS 1993; REDDY et al. 1993; GROENINK et al. 1996). Dabei sind Muzine hochmolekulare Bestandteile des Biofilms, der die Schleimhäute bedeckt und ein Schutz vor mechanischen und chemischen Angriffen darstellt (TROXLER et al. 1997). Zusätzlich zur Funktion der epithelialen Protektion durch das Glykoprotein ist auch der Einfluss auf die fetale Entwicklung im Sinne sowohl einer Wachstumsstimulierung als auch -hemmung des Organismus beschrieben worden. U.a. hat eine Untersuchung von Buisine und Mitarbeitern gezeigt, daß die Genaktivierung von Muc1, Muc4, Muc5AC, Muc5B und Muc6 zwischen der achten und 27. Schwangerschaftswoche die Entwicklung des Gastrointestinaltrakts beeinflusst (BUISINE et al. 2000). Weiterhin gehören Überexpression im Zusammenhang mit Neoplasien zu den bisher erforschten Eigenschaften der Muzine (RETZ et al. 1998; MONIAUX et al. 2001).

Grundsätzlich gibt es ein mucöses Glykoprotein 1 (MG1) am ehesten als Genprodukt des Muc5B- und MUC4-Gens (THORNTON et al. 1999; WICKSTROM et al. 2000). Das mucöse Glykoprotein 2 (MG2) hingegen ist das Produkt des Muc7-Gens, das sich in seinem Aufbau und seinen Bestandteilen vom MG1 Glykoprotein unterscheidet und in zwei verschiedenen Formen (MG2a und MG2b) vorkommt (RAMASUBBU et al. 1991). Der Unterschied zwischen MG2a und MG2b besteht lediglich in ihrem Gehalt an Sialylsäure und Fucose-Anteil bei ansonsten identischer Aminosäurenkomposition (MEHROTRA et al. 1998; LIU et al. 2000). Bisher sind die Glykoproteine MG1 sowie MG2a und MG2b unter anderem im Oropharynx und speziell in den Glandulae submandibularis, sublingualis und palatinae nachgewiesen worden (COHEN et al. 1991; NIELSEN et al. 1996).

Als weitere Muzinglykoproteine sind Muc1-4, Muc5 AC (homolog zum C-terminalen Ende des Von-Willebrand-Faktors), Muc5 B; Muc6-13, Muc15-18 und Muc20 bekannt (Tabelle 1) (GUM et al. 1989; BOBEK et al. 1993; SHANKAR et al. 1994; MONIAUX et al. 2001;

HIGUCHI et al. 2004). Von den folgenden sechs Muzinen sind dabei die kompletten cDNA - Sequenzen bekannt: Muc1, Muc2, Muc4, Muc5B, Muc5AC und Muc7.

Grundsätzlich zeigt das humane Muzingen drei Merkmale: Zunächst eine sich wiederholende Nukleotid-Tandem Domäne, sowie eine Peptiddomäne mit einer hohen Konzentration an Serin und Threonin und schließlich ein Komplex, der die RNA kodiert (MONIAUX et al. 2001).

Tabelle 1: Charakteristische Merkmale der Muzine

| Muzin Typ | Repeat-Sequenz | Expression | Gel-formierend | Chromosom Lokalisation |
|------------------------|--------------------------------|---|----------------|------------------------|
| MUC1 | PDTRPAPGSTAPPAHCV TSA | Brustdrüse, Darm, Pankreas, Konjunktiva, Lunge, Niere, Kornea, Ektozervix, Vagina | nein | 1q21 |
| MUC2 | PTTTPITTTTTVTPTPTPT GTQT | Dickdarm, Dünndarm, Konjunktiva Bronchialsystem | ja | 11p15 |
| MUC3 Muc3a Muc3b | HSTSFSSITTETTS | Dickdarm, Dünndarm, Gallenblase | nein | 7q22 |
| MUC4 | TSSASTGHATPLPVD | Bronchialsystem, Ektozervix, Konjunktiva, Vagina, Dickdarm | nein | 3q29 |
| MUC5AC | TTSTTSAP | Bronchialsystem, Konjunktiva, Magen | ja | 11p15 |
| MUC5B | SSTPGTAHTLVLTATTATT PTATGSTATP | Gl.submandibularis, Bronchialsystem, Gallenblase, Pankreas | ja | 11q15 |

| | | | | |
|--------------------|--|--|-------------|----------------|
| MUC6 | SPFSSTGPMTATSFQ TTTTYPTPSHPQTTL THVPPFSTSLVTPST GTVITPTHAQMATS ASIHSTPTGTIPPPTT LKATGSTHTAPPMT PTTSGTSQAHSSFST AKTSTSLHSHTSSTH HPEVTPTSTTTITPNP TSTGTSTPVAHTTSATSS RLPTPFTTHSPPTGS | Magen, Gallenblase | ja | 11p15 |
| MUC7 | TTAAPPTPSATTPAPPS SSAPPG | Gl.submandibularis | nein | 4q13-21 |
| MUC8 | TSCPRPLQEGTPGSRAA HALSRRGHRVHELPTSS PGGDTGF | Bronchialsystem | n.d. | 12q24.3 |
| MUC9 | n.d. | Eileiter | n.d. | 1p13 |
| MUC11 | SGLSEESTTSHSSPGSTH TTLSPASTTT | Kolon, Uterus Prostata, Appendix, Dünndarm, Leber, Niere, Lunge, Pankreas, Thymus | nein | 7q22 |
| MUC12 | SGLSQESTTFHSSPGSTE TTLSPASTTT | Kolon, Pankreas | nein | 7q22 |
| MUC13 | n.d. | Kolon, Hämatopoetische Zellen | nein | 3 |
| MUC15 [#] | n.d. | Milz, Thymus, Prostata, Dünndarm, Colon, Tonsillen | nein | 11p14.3 |
| MUC16* | GPLYSCRLTLR, ELGPYTL, FTLNFTIXNL, und PGSRKFNXT, | CA125, Ovarial-Ca-Antigen, Corneaepithel | nein | 19q13.2 |
| MUC17 | n.d. | Pankreas-Ca | nein | 7q22 |
| MUC18 | n.d. | Immunglobulin, Malignes Melanom | n.d. | 11q23.3 |
| MUC20° | 2-,4- und 5- Repeat Typen | Niere, Speicheldrüse | n.d. | 3q29 |

n.d.: not determined,

*** n.** (YIN and LLOYD 2001),

° n. (HIGUCHI et al. 2004),

n. (PALLESEN et al. 2002)

GUM et al. 1989, BOBEK et al. 1993, SHANKAR et al. 1994, MONIAUX et al. 2001, HIGUCHI et al. 2004)

1.2. Chemische Eigenschaften der Muzine

Die genetisch determinierten Peptidketten der Muzine werden in den Ribosomen der Epithelzelle synthetisiert. Die Kohlehydratketten hingegen werden im Golgiapparat der Zelle mit Hilfe von Glykosidasen und Glykosyltransferasen aufgebaut.

Nach Art der glykosidischen Bindung zwischen dem reduzierten Arm der Kohlenhydratseitenkette und der funktionellen Gruppe der Aminosäure im Protein wird unterschieden in O-, N- und S- Glykoproteine.

Bei den N- Glykoproteinen ist der Oligosacharidanteil über 2-Acetamido-2-desoxy-D-Glucose (GlcNac) durch eine β -N- glykosidische Bindung an die Amidgruppe der Aminosäure Asparagin gebunden.

Bei den O- Glykopeptiden liegt dagegen in der Mehrzahl der Glykopeptide eine α -O- glykosidische Bindung zwischen dem Kohlenhydratanteil und der Hydroxylaminosäure, zumeist Serin oder Threonin, vor.

Die bevorzugten Glykosylierungsmuster sind die Core A und die Core B- Struktur. In der Core A-Struktur ist die 2-Acetamido-2-desoxy-D- Galaktose (GalNac) α -O- glykosidisch an eine Hydroxylaminosäure wie Threonin oder Serin gebunden (siehe Tabelle 2). Bei der in der proteoglykanen Core B Struktur ist die D-Xylose β -O- glykosidisch mit einer Hydroxylaminosäure verknüpft.

Tabelle 2: Die Core- Strukturen A und B bilden die Grundstruktur der O- Glykoproteine. Core C tritt in N- Glykoproteinen auf.

| | |
|---------------|--|
| Core A | D-Gal- β (1-3)-D- GalNac- α (1-O)- Thr/ Ser |
| Core B | D-Gal- β (1-3)-D- Gal- β (1-4)-D-Xyl- β (1-O)- Ser |
| | D-Man |
| | α (1-3) |
| Core C | D-Man- α - (1-4)-D-GlcNac- β (1-4)-D- GlcNac- β (1-N)-Asn |
| | α (1-3) |
| | D-Man |

Neben ihrem Kohlenhydratanteil weisen die Glykoproteine im zentralen Bereich einen repetitiven Proteinanteil auf. Da die erste Aminosäure im repetitiven Anteil zugleich die letzte Aminosäure bildet, spricht man von einer „Tandem Repeating Unit“. Die Tandem Repeating Unit enthält im Vergleich zum restlichen Proteinanteil besonders bevorzugt Serin und Threonin als potentielle O- Glykosylierungsstellen. Ferner findet man einen hohen Anteil an Alanin, Glycin und Prolin. In den kleineren terminalen Regionen findet man auch N-glykosidisch gebundene Kohlenhydratanteile sowie Cysteineinheiten, welche die Proteine mittels Disulfidbrücken zu großen Molekülen vernetzen.

Die Eigenschaft eines Muzins wird u.a. durch die tragende Aminosäure und ihre Eigenschaften beeinflusst. Während Prolin eine apolare Aminosäure ist, sind Serin, Threonin und Cystein polare Aminosäuren und Histidin eine basische Aminosäure. Nach ihrer Struktur und Funktion unterscheidet man zwischen exprimierten und membrangebundenen Muzinen. Im Gegensatz zu den exprimierten Muzinen sind membrangebundene Muzine über ein lipophiles transmembranes Proteinfsegment in der Plasmamembran fest verankert (STROUS and DEKKER 1992).

Basierend auf ihre Aminosäuresequenz werden Muzine in drei Familien kategorisiert (CORRALES et al. 2003):

| | |
|----------------------------------|--|
| Gel-forming (gelbildend): | Muc2, Muc5AC, Muc5B, Muc6 |
| Soluble (wasserlöslich): | Muc7, Muc9 und Muc20 |
| Transmembrane: | Muc1, Muc3a, Muc3b, Muc4, Muc13, Muc15, Muc16 und Muc17, (Muc18), Muc20 |
| Nichtkategorisierbare: | Muc8 und Muc11 |

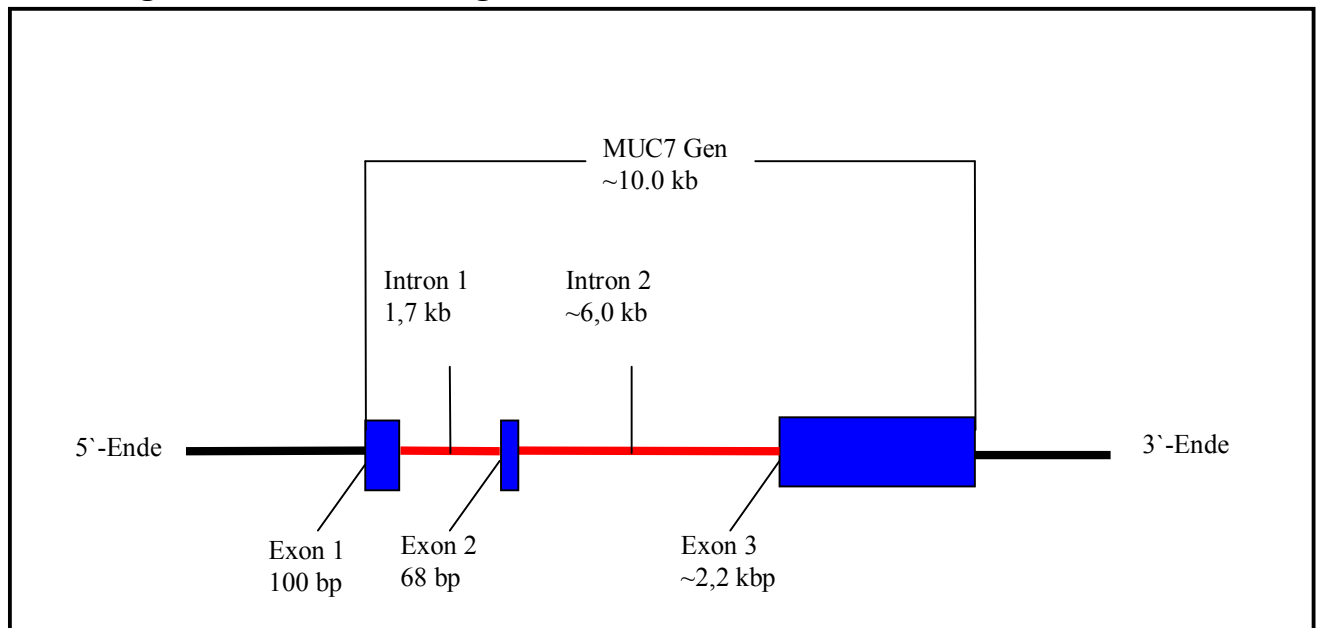
1.2.1. MG1 und MG2

MG1 ist 3000 kDa schwer und besteht aus 15% Protein-, 78% Carboanhydrat- und 7% Sulfatanteil. MG2 ist ein kleines monomeres Glykoprotein mit einem molekularen Gewicht bis zu 200 kDa und besteht aus insgesamt 30% Protein-, 68% Carboanhydrat-, 1,6% Sulfatanteil und 0,4% Kalzium mit 150.000 bis 250.000 Monomeren und wird vom Muc7–

Gen kodiert (LEVINE et al., 1987; COHEN and LEVINE, 1989; REDDY et al., 1992; BOBEK et al., 1993).

Durch Insitu- Hybridisierung konnte das Gen für Muc7 auf dem Chromosom 4q13-21 lokalisiert werden (BOBEK et al. 1996). Das Gen besteht aus 10 kbp und kodiert 3 Exons und 2 Introns. Der für das Protein kodierende Teil liegt auf dem Exon 3 (siehe Abb 1) und ist ungefähr 2,2 kbp groß (BOBEK et al. 1996; MEHROTRA et al. 1998).

Abbildung 1: Schemat. Darstellung des MUC7-Gens modifiziert n. Bobek et al. 1995



Das kodierte Muzin des Muc7-Gens wurde von Bobek und Mitarbeitern 1993 aus dem Mundspeichelsekret isoliert und der molekulare Aufbau sowohl des Gens in seiner Nukleotidsequenz sowie des Proteins einschließlich der Kohlenhydratkomponente vollständig dargestellt (BOBEK et al., 1993). Elektronenmikroskopisch stellen sich die MG2 Glykoproteine als kurze flexible spiralförmige Strukturen mit einer Länge von 30 bis 120 nm dar.

Das Mucoglykoprotein MG2 ist, wie bereits oben erwähnt, das Produkt des Muc7 Gens. Das sezernierte Muc7-Apomuzin (Proteinkomponente) besteht aus einer N- terminalen Region, die eine Histatin- ähnliche Domäne sowie Serin- und Threoninreiche wiederholende Sequenzen beinhaltet und ein C- terminales Ende bestehend aus Cystein- Molekülen (BIESBROCK et al. 1991; BOBEK et al. 1993).

Nach Liu und Mitarbeitern wird das Apomuzin, die Vorstufe des später sezernierten Proteins, in drei Domänen eingeteilt (Abb.2): Zunächst die N- terminale Region, die 144 Aminosäuren enthält. Eine Zentralregion mit 145-283 Aminosäuren enthält in der Regel sechs identisch lange Tandem Repeat Domänen. Jedes der Tandem Repeat- Domänen besteht aus Sequenzen mit jeweils 23 Aminosäuren (Abb.3). Schließlich enthält das C- terminale Ende 74 Aminosäuren (LIU et al. 2000).

Abbildung 2: Schematische Darstellung des MG2 Glykoproteins

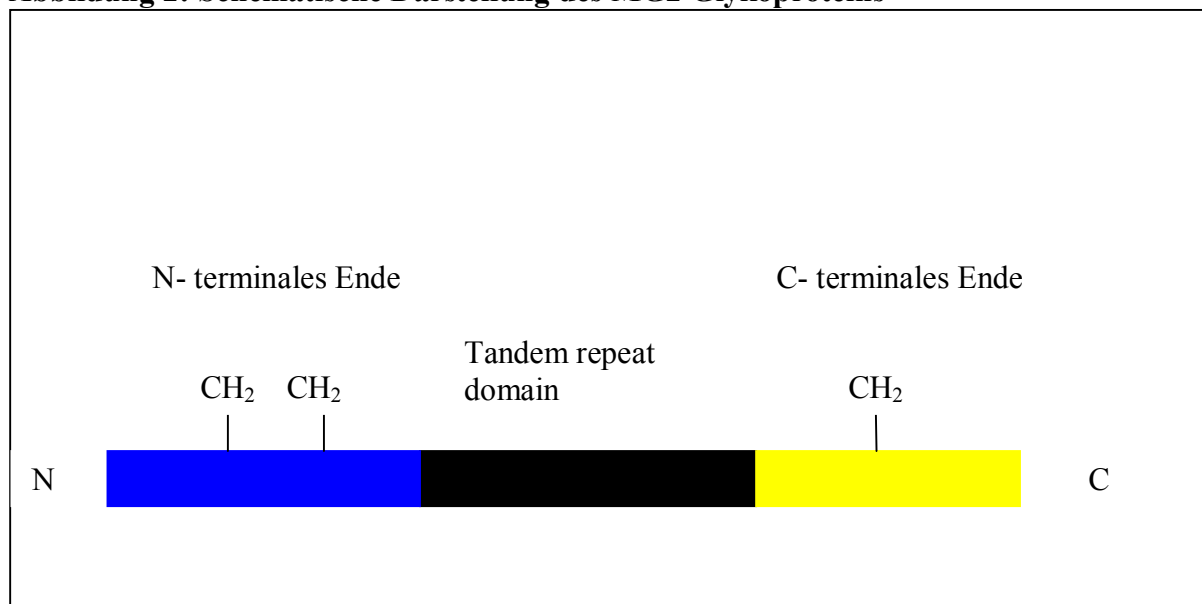


Abbildung 3: Aminosäuresequenz des MG2 mit sechs Tandem Repeat- Sequenzen

| | |
|--|-----------|
| E-R-E-R-D-H-E-L-R-H-R-R-H-H-H-Q-S-P-k-S-H-F-E-L-P-H-YP-G- | (1-30) |
| L-L-A-H-Q-K-P-F-I-R-K-S-Y-K-C-L-H-K-R-C-R-P-K-L-P-P-S-P-N-K- | (31-60) |
| P-P-K-F-P-N-P-H-Q-P-P-K-H-P-D-K-N-S-S-V-V-N-P-T-L-V-A-T-T-Q- | (61-90) |
| I-P-S-V-T-F-P-S-A-S-T-K-I-T-T-L-P-N-V-T-F-L-P-Q-N-A-T-T-I-S- | (91-120) |
| S-R-E-N-V-N-T-S-S-S-V-A-T-L-A-P-V-N-S-P-A-P-Q-D- <u>T-T-A-A-P-P-</u> | (121-150) |
| <u>T-F-S-A-T-T-P-A-P-P-S-S-S-A-P-P-E-T-T-A-A-P-P-T-P-S-A-T-T-Q-</u> | (151-180) |
| <u>A-P-P-S-S-S-A-P-P-E-T-T-A-A-P-P-T-P-A-T-T-P-A-P-P-S-S-S-A-</u> | (181-210) |
| <u>P-P-E-T-T-A-A-P-P-T-P-S-A-T-T-P-A-P-L-S-S-S-A-P-P-E-T-T-A-V-</u> | (211-240) |
| <u>P-P-T-P-S-A-T-T-L-D-P-S-S-A-S-A-P-P-E-T-T-A-A-P-P-T-P-S-A-T-</u> | (241-270) |
| <u>T-P-A-P-P-S-S-P-A-P-Q-E-T-T-A-A-P-I-T-T-P-N-S-S-P-T-T-L-A-P-</u> | (271-300) |
| <u>D-T-S-E-T-S-A-A-P-T-H-Q-T-T-T-S-V-T-Q-T-T-T-T-K-Q-P-T-S-A-</u> | (301-330) |
| P-G-Q-N-K-I-S-R-F-L-L-Y-M-K-N-L-L-N-R-I-I-D-D-M-V-E-Q | (331-357) |

*: modifiziert nach (TROXLER et al. 1997; ZALEWSKA et al. 2000)

1.2.2. Rekombinantes Muc7 und seine Eigenschaften

Wie bereits in der bisherigen Literatur gezeigt wurde, besteht eine Interaktion zwischen einer Reihe von Mikroorganismen und MG2. Hier kommen den drei Domänen des MG2 jeweils eigene Funktionen zu. So konnte mit Hilfe rekombinanter Proteine gezeigt werden, dass das N-terminale Ende von MG2 als Anbindungsstelle für *Streptokokkus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. gingivalis* und (Herpes-simplex) HSV-1 (Herpes-simplex Virus) sowie HIV-1 (Humanes Immunodefizienz Virus) dient (LIU et al. 2000; SITU et al. 2003). Weiterhin wird dem C-terminalen Ende des Proteins eine Bedeutung hinsichtlich einer antimykotischen Wirkung zugeschrieben (BOBEK et al. 2003).

Auch die Arbeitsgruppe um Biesbrock hat bereits 1991 gezeigt, daß bei der MG2-gesteuerten Immunabwehr im Mund die Interaktion zwischen dem MG2-Molekül und *Staphylokokkus aureus* oder *Pseudomonas aeruginosa* abhängig von einer Komplexbildung zwischen MG2 und IgA ist. Hingegen bindet eine aufgereinigte MG2-Lösung ohne IgA kaum an Bakterien an.

1.2.3. Isoformen des MG2-Proteins

Wie bereits erwähnt, gibt es zwei Isoformen des MG2. MG2a und MG2b besitzen die gleiche Aminosäurezusammensetzung, aber unterschiedliche Sialylsäuren (N-Acetylneuraminsäuren) und Fucose- Anteile (BOBEK et al. 1996). MG2a enthält zu 14% N-Azetylneuraminsäure und zu 16% Fucose, während MG2b zu 27% aus N-Azetylneuraminsäure und zu 7% aus Fucose besteht (RAMASUBBU et al. 1991; MEHROTRA et al. 1998).

1.3. Bedeutung der Muzine im Harntrakt

Es ist hinreichend bekannt, dass eine Induktion der Expression bestimmter Muzine durch Kontakt mit infektiösen Mikroorganismen im Bereich des Oropharynx der oberen Atemwege und der Lunge (Mucoviszidose) hervorgerufen werden kann (BOBEK et al. 1996; KIRKBRIDE et al. 2001; MATHOERA et al. 2002). Im Harn-bildenden und Harn-ablaufenden Bereich sind bislang keine systemischen Untersuchungen bekannt worden.

Das MG2 enthält zwei Cystein- Residuen im N-terminalen Ende und ist u.a. im Oropharynx verantwortlich für die antimikrobielle, antimykotische und antivirale Wirkung des Muzins (LIU et al. 2000). Zu diesen Microorganismen zählen orale Streptokokken, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylokokkus aureus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und *Eikenella corrodens*. Um dies zu veranschaulichen haben Liu und Mitarbeiter das pNMUC7, ein kodierendes Plasmid des NMUC7 zur Synthese des rekombinierten NMUC7 (N-terminales Ende mit 144 Aminosäuren des Muc7) in *E. coli* Bakterien rekonstruiert. Die Untersuchungen zeigten eine Anbindung des rNMUC7 an die oralen Bakterien, insbesondere des *S. mutans*. Nach einer Alkylierung der zwei Cysteinresiduen kam es allerdings zur Aufhebung der bakteriellen Bindung am N-terminalen Ende, was die Bedeutung der Cystein-Residuen unterstreicht. Das MG2 ist weiterhin in der Lage das HIV-Virus 1 zu agglutinieren. Die Aktivität des Glykoproteins gegen *Candida Albicans* ist auf die Histatin-ähnliche Domäne zurückzuführen, die durch die Histidin- Ketten im Proteinbereich fungizid wirken (MONIAUX et al. 2001).

In den ableitenden Harnwegen stellen vorwiegend gelbildende Muzine eine physikalische Barriere zwischen den oberflächlichen Epithelzellen und dem sauren Urin dar. Durch Ihre O-Oligosaccharide in der Tandem repeat- Sequenz binden sie an Mikroorganismen und induzieren die Migration von Leukozyten. In der Harnblase wird eine schützende Funktion für das Urothel hinsichtlich Änderungen des pH-Wertes und der Osmolarität des Urins diskutiert (OKEGAWA et al. 2003)

1.4. Die chronische Pyelonephritis

Durch chronisch einwirkende pathogene Bakterien oder Bakterienbestandteilen wird eine Entzündung des Niereninterstitiums mit in Schüben fortschreitender Parenchymdestruktion – einer sogenannten chronisch destruierende interstitielle Nephritis - verursacht.

Die Prävalenz liegt bei 7%, wobei Frauen dreimal häufiger betroffen sind als Männer. Je nach Entstehungsmechanismus kann es sich dabei um Formen einer Reflux- Nephropathie oder Obstruktion im Bereich des oberen Harntraktes handeln. Die Pathogenese ist bei chronischem Verlauf retrospektiv nicht immer eindeutig zu bestimmen. Häufig treten in diesem Zusammenhang Infektionen verursacht durch Bakterien wie *E. Coli*, Enterokokken, Klebsiellen oder *Proteus species* auf. Morphologisch makroskopisch sind die chronisch pyelonephritisch veränderten Nieren verkleinert. Sie weisen eine höckrige Oberfläche mit

narbigen Einziehungen auf. Histologisch findet man im vernarbten Interstitium schütterte bis dichte Lymphoplasmazelluläre Infiltrate. Die Tubuli sind in den Narbenbezirken atrophisch und zeigen verbreiterte Basalmembranen.

1.4.1. Diagnostik der Pyelonephritis

Zur Diagnostik der Pyelonephritis gehört die klinische Untersuchung sowie die Interpretation des Harnsediments (spezifisches Gewicht, pH, Blutbeimengung, Proteine, Glucose, Leukozyten, Bakterien), und Anlegen einer Urinkultur zur Isolierung eines Keimes aus Mittelstrahl- oder sterilem Katheterurin. Gleichsam wird das Blut serologisch auf erhöhte Entzündungsparameter (C-reaktives Protein und Leukozyten) und Retentionswerte (Kreatinin und Harnstoff) untersucht. Die Ultraschalluntersuchung dient zum Nachweis narbiger Einziehungen bzw. einer Schrumpfniere und Erweiterung der Kelchsystems bei Harnstau. Weiterhin kommen unter Umständen bildgebende Untersuchungsverfahren wie das konventionelle Ausscheidungsurogramm bzw. Computer- und Kernspintomographie sowie funktionelle Untersuchungen wie eine nuklearmedizinische Nierenfunktionsprüfung zum Einsatz.

1.4.2. Therapie der Pyelonephritis

Die Pyelonephritis wird idealerweise Antibiotogramm-gerecht je nach klinischem Schweregrad oral bzw. i.v. antibiotisch behandelt. Entsprechend der Rezidivhäufigkeit und Keimspektrum (nosokomial vs extra-nosokomial) gewinnt die Resistenzentwicklung der Erreger dabei an Bedeutung.

1.5. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Bisher gibt es eine Reihe von Publikationen über den Nachweis von Mucin- Genexpression in der molekularen Onkologie (RETZ et al. 1998, SWARTZ et al 2002, MONIAUX et al 2004 und SINGH et al 2006), weitere Arbeiten beschäftigen sich speziell mit dem Nachweis von Muc7- Genexpression im Bereich des Oropharynx, wo das Immunsystem mit einer Reihe von

potentiell pathogen infektiösen Noxen konfrontiert wird. In der Literatur ist keine systematische Untersuchung über die Muc7-Expression im Zusammenhang mit Infektionen im Bereich des Urogenitaltraktes bekannt.

Wir untersuchten die Genexpression von MUC7 und seinem Proteintranskript MG2 im Urin von Patienten mit akuter Pyelonephritis sowie in Nierengewebsproben von Patienten, die sich einer Nephrektomie bei chronisch rezidivierender Pyelonephritis mit nachfolgendem Funktionsverlust der Niere unterzogen. Die Ergebnisse wurden jeweils verglichen mit Urinproben von gesunden Probanden bzw. normalen Nierengewebsproben aus tumortragenden Nieren.

2. Material und Methoden

Sowohl laborübliche Reagenzien wie Natronlauge oder Magnesiumchlorid, die von den Firmen Sigma, Merck oder Braun in höchster Reinheitsstufe bezogen wurden, als auch übliche Gerätschaften wie Pipetten, Küvetten und Glaswaren sind im Folgenden nicht aufgeführt.

2.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

2.1.1. Materialien für die Zellkultur

- Zelllinie RT-4 American Type Culture Collection,
Rockville, USA
- RPMI 1640 Nährmedium Fa Biochrom, Berlin
- Fötale Kälberserum Fa Biochrom, Berlin
- Phosphate buffered saline solution (PBS Dulbecco`s)
Fa Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
- Trypsin/ EDTA – Lösung (0,05%/0,02%) in PBS ohne Calcium und Magnesium
Fa Biochrom, Berlin
- Natrium-Pyruvat Fa Biochrom, Berlin
- Glutamin Fa Biochrom, Berlin
- DMSO - Lösung (Dimethylsulfoxid)
Fa Merck, Darmstadt
- Chloroform CH Cl₃ Fa Merck, Darmstadt
- Absolutes Isopropanol 96-99% (2 - Propanol)
Fa Merck, Darmstadt
- Glykogen Fa Boehringer, Mannheim
- Poly-L-Lysin Fa Biochrom, Berlin
- Ficoll Dichte 1,077 g/ml Fa Biochrom, Berlin
- PCR Mykoplasmen Kit TaKaRa, Genevilliers, Frankreich
- Wärmeblock, Typnr. 2100 Fa Liebisch, Bielefeld
- Zentrifuge, 202 MK Fa Sigma, Deisenhofen

2.1.4. Materialien für die Polymerase – Kettenreaktion:

- Superscript™ II RNase H-Reverse Transcriptor 10.000 U
Fa Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
- Random Hexamers
Fa Perkin Elmer, Weiterstadt
- RNase Inhibitor
Fa Perkin Elmer, Weiterstadt
- 100 bp DNA Ladder
Fa Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
- Taq Polymerase
Fa Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
- 10x Tris-Acetate-EDTA-Buffer
Fa Sigma, Deisenhofen
- Gene Amp d-NTP's 10 mM
Fa Perkin Elmer, Weiterstadt
- 6x Loading Dye Solution for DNA Markers
Fa MBI Fermentas
- Oligo dt 12-18 Primer
Fa Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
- Primer für die RT-PCR
MWG-Biotech, Ebersberg:
- PCR-Block UNO 96
Fa Biometra, München

Tabelle 3: Primer für das Muc7-Gen

| | | |
|--------|-----------------------|--------------------------------|
| Muc7-A | Muc7 Extern-Sense | 5'-TTGGCTAAAAGCAAGCAACTGG-3' |
| Muc7-B | Muc7 Extern-Antisense | 5'-TTGGTGGGAAGCTGATGGGAAAG-3' |
| Muc7-C | Muc7 Intern-Sense | 5'-CACACTGCACCAGAGACATCAGAA-3' |
| Muc7-D | Muc7 Intern-Antisense | 5'-AGCCACTAAGGTAGGGTTGACCAC-3' |

Tabelle 4: Primer für die externe und interne PCR

| | | |
|---------|-----------------|-----------------------------|
| GAPDH-A | GAPDH Sense | 5'-CCAGCCGAGCCACATCGCTC-3' |
| GAPDH-B | GAPDH Antisense | 5'-ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3' |

2.1.5. Pufferlösungen und Agarosegele

| | |
|--|---|
| TE- Puffer: | 500 µl Tris (1 M/l) und 1000 µl EDTA (0,05 M/l) mit Aqua dest. auf 50 ml auffüllen. |
| Trizin- Puffer: | <ol style="list-style-type: none"> 1. 17,92 g Trizin in 80 ml Aqua dest. lösen und mit NaOH den PH-Wert auf 8,4 einstellen und mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen und den Puffer autoklavieren. 2. 1 g Gelatine mit 100 ml Aqua dest. mischen und autoklavieren. 3. 20,33 g Mg Cl in 100 ml Aqua dest. lösen und autoklavieren. 4. 3 ml 1 M Trizin (pH 8,4), 1 ml 1%ige Gelatine, 200 µl 1 M MgCl₂, 5,7 ml Aqua dest., 100 µl Polyethylen- 9- Lauryl-Ether, 35 µl 2- Mercaptoethanol miteinander mischen. |
| PBS-Puffer: | 9,55 g PBS in 1 L Aqua dest. lösen. |
| Zitrat-Puffer: | 2,1 g Zitrat in 1 l Aqua dest. lösen, mit NaOH einen pH-Wert von 6,0 einstellen. |
| H ₂ O ₂ -Methanol-Gemisch: | 200 ml absolutes Methanol und 3 ml 35%iges Wasserstoffperoxid |
| Agarosegel: | 2 g Agarose für 1%iges, 4 g Agarose für 2%iges Agarosegel mit 200 ml TAE-Puffer vermischen und bei 500 Watt für 3 Minuten in der Mikrowelle erhitzen. Mit Hilfe eines Rührkerns Agarosepartikel vollständig auflösen. Die Lösung nach Abkühlung auf Handwärme, bei noch flüssigem Zustand in die Gelkammer gießen und nach abgeschlossener Polymerisation (feste Konsistenz) den Kamm entfernen. |

2.1.6. Immunhistochemie

2.1.6.A Reagenzien für Immunhistochemie

| | |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| Histo Bond Adhäsionsobjektträger | Marienfeld Glaswaren, Bad Mergentheim |
| Avidin/Biotin-Blocking Kit | Vector, Burlingame CA; USA |
| Zitrat | Merck, Darmstadt |
| DAB Substrat | Vector, Burlingame CA; USA |
| Deckgläser | Menzel, Braunschweig |
| Ethanol absolut zur Analyse | Merck, Darmstadt |
| Hämalaun | Merck, Darmstadt |
| Methanol absolut | Merck, Darmstadt |
| Pertex | Medite, Burgdorf |
| PBS | Biochrom, Berlin |
| Vectastain ABC Kit (Mouse IgG) | Vector, Burlingame CA; USA |
| Wasserstoffperoxid | Merck, Darmstadt |
| Xylol | Merck, Darmstadt |

2.1.6.B Geräte für Immunhistochemie

| | |
|---------------------------|--|
| Dampfdrucktopf | Fissler GmbH, Idar-Oberstein |
| Gelkammer, klein | Agagel Mini, Biometra, Göttingen |
| Gelkammer, groß | Agagel Wide, Biometra, Göttingen |
| Heiz- und Magnetrührgerät | IKA, Staufen i. Breisgau |
| Kamera | Polaroid P, St. Albans, Großbritannien |
| Polaroid Film, Typ 667 | Polaroid, St. Albans, Großbritannien |
| Mikrowelle | Panasonic, Hamburg |
| Mörser mit Pistill | Omnilab, Hamburg |
| Rotationsmikrotom RM 2145 | Leica, Wetzlar |
| Thermocycler | Uno-Thermoblock, Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, München |
| Wärmeblock | Typnr. 2100, Liebisch, Bielefeld |
| Zentrifuge | 202 MK, Sigma, Deisenhofen |

2.1.6.C Antikörper für Immunhistochemie

Der monoklonale MUC7 Antikörper PANH3 wurde freundlicherweise von Dr. P. A. Clausen (Department of Oral Diagnostics, Faculty of Health Science, School of Dentistry, University of Copenhagen, DK) zur Verfügung gestellt (Nielsen et al., 1996).

2.1.7. Nierengewebe

Alle untersuchten Gewebeproben von 15 entzündeten Nierengeweben und 10 normalen Nierengeweben wurden unabhängig vom Geschlecht oder Alter der Patienten, je nach klinischer Diagnose und Histologie des Präparates verwendet. Die Proben stammen aus der urologischen Klinik der Christian- Albrechts- Universität zu Kiel. Gewebeproben wurden nur nach präoperativer Einverständniserklärung des Patienten entnommen.

Für die RNA-Extraktion wurden frische Gewebeproben unmittelbar nach der Entnahme noch im Operationssaal in flüssigem Stickstoff konserviert und weiter bei -80 °C gelagert. Aus jedem Organ wurde sowohl Tumorgewebe, entzündliches Gewebe als auch Normalgewebe entnommen. Eine benachbarte Probe des Gewebes wurde zur histologischen Untersuchung an das pathologische Institut der Christian- Albrechts- Universität zu Kiel eingeschickt. Für die Erstellung der Paraffinschnitte standen die im Institut für Pathologie der Universitätsklinik zu Kiel im Rahmen der Routine-Untersuchung hergestellten Paraffinblöcke zur Verfügung.

2.1.8. Gewebeproben:

Die untersuchten Gewebeproben aus normalem und chronisch entzündlichem Nierengewebe:

Tabelle 5: Nierennormalgewebe (NG)

| Nr.: | Alter | Geschlecht | Histologie |
|------|-------|------------|--------------------|
| 1 | 47 | M | Nierenzellkarzinom |
| 2 | 59 | W | Nierenzellkarzinom |
| 3 | 61 | W | Nierenzellkarzinom |
| 4 | 63 | M | Nierenzellkarzinom |
| 5 | 67 | M | Nierenzellkarzinom |
| 6 | 67 | M | Nierenzellkarzinom |
| 7 | 68 | M | Nierenzellkarzinom |
| 8 | 68 | M | Nierenzellkarzinom |
| 9 | 71 | W | Nierenzellkarzinom |
| 10 | 75 | M | Nierenzellkarzinom |

Tabelle 6: Chronisch entzündetes Nierengewebe, Pyelonephritis (PN)

| Nr.: | Alter | m/w | Histologie |
|------|-------|-----|---|
| 1 | 1 | m | Harnstauungsniere, Reflux bei Doppelnieren |
| 2 | 32 | m | Hydronephrose |
| 3 | 34 | w | Pyelonephritische Schrumpfnieren |
| 4 | 34 | m | Infizierte, funktionslose Harnstauungsniere |
| 5 | 50 | w | Harnstauungsniere |
| 6 | 53 | w | Pyelonephritische Schrumpfnieren |
| 7 | 60 | m | Chronische eitrige Nephritis |
| 8 | 63 | w | Harnstauungsniere |
| 9 | 64 | w | Pyelonephritis |
| 10 | 67 | m | Pyelonephritis |
| 11 | 67 | m | Chronische Pyelonephritis |
| 12 | 68 | w | Destruierende Pyelonephritis |
| 13 | 71 | w | Harnstauungsniere |
| 14 | 74 | w | Teilweise abszedierende Pyelonephritis |
| 15 | 75 | m | Destruierende Pyelonephritis |

2.1.9. Probanden für Sammelurin

Die Urinproben von 15 Patienten mit einer akut aufgetretenen Pyelonephritis stammen von Patienten aus der urologischen Klinik und Poliklinik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Die Kontrollurine stammen von gesunden Probanden (Mitarbeiter der Urologischen Klinik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel). Alle Probanden waren zur Verarbeitung und Verwendung Ihrer Daten und Urinproben für diese Arbeit einverstanden. Die Proben wurden im Zeitraum zwischen 11/1999 und 08/2001 gesammelt.

Hierfür wurden die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt. Die Gruppe der Patienten mit Pyelonephritis und die gesunde Gruppe haben mittels Spontanmiktion Urin mit einem Volumen zwischen 100 und 500 ml in Sarstedt- Flaschen gesammelt. Die Proben wurden dann innerhalb von 30 Minuten nach Miktion weiterverarbeitet.

Tabelle 7: Sammelurinproben von Pat. mit Harnwegsinfektion

| Lfd. Nr.: | DB Nr. | Geschlecht | Alter |
|-----------|--------|------------|-------|
| 1 | 549 | m | 67 |
| 2 | 557 | w | 81 |
| 3 | 566 | m | 61 |
| 4 | 572 | m | 65 |
| 5 | 596 | m | 70 |
| 6 | 733 | w | 44 |
| 7 | 738 | w | 77 |
| 8 | 740 | m | 69 |
| 9 | 760 | w | 48 |
| 10 | 764 | m | 69 |
| 11 | 765 | m | 75 |
| 12 | 766 | m | 65 |
| 13 | 774 | m | 43 |
| 14 | 834 | w | 78 |
| 15 | 855 | m | 49 |

Tabelle 8: Sammelurin von Gesunden Probanden

| Lfd. Nr. | DB Nr. | Geschlecht | Alter |
|----------|--------|------------|-------|
| 1 | 453 | m | 32 |
| 2 | 477 | m | 30 |
| 3 | 478 | m | 66 |
| 4 | 583 | m | 80 |
| 5 | 593 | m | 70 |
| 6 | 598 | m | 69 |
| 7 | 771 | w | 26 |
| 8 | 848 | m | 33 |
| 9 | 857 | m | 53 |
| 10 | 859 | w | 23 |
| 11 | 864 | m | 31 |
| 12 | 928 | m | 63 |
| 13 | 929 | w | 60 |
| 14 | 934 | m | 33 |
| 15 | 945 | w | 26 |

2.1.10. Zelllinie

In der vorliegenden Arbeit wurde die Blasenkarzinomzelllinie RT-4 mit dem Differenzierungsgrad G1 (WILLIAMS et al., 1980) als Muc7 positive Kontrolle für die PCR eingesetzt. Diese Zelllinie wurde von der American Type Culture Collection ATCC, Manassa, Virginia, USA bezogen.

2.1.11. Kultivierung der Zellkulturen

Die Zellkultivierung erfolgte in RPMI 1640 Medium mit Zugabe von 10% hitzeinaktiviertem Kälberserum, 2 mmol/l L-Glutamin und 1 mmol/l Natrium- Pyruvat. Die Kultivierung erfolgte bei einer Temperatur von 37°C und einer feuchten 5%igen CO₂-Atmosphäre. Alle Zelllinien wurden routinemäßig bei jeder neuen Zellpassage auf Mykoplasmen- Kontamination im mikrobiologischen Institut der Christian- Albrechts- Universität zu Kiel überprüft und kontaminierte Kulturen wurden verworfen.

2.1.12. Erstellen von neuen Zellpassagen

Das alte Nährmedium wurde aus der Kulturflasche entnommen und verworfen. Um die Zellen am schonendsten vom Flaschenboden zu lösen, wurden die Zellen zunächst mit 10 ml PBS Dulbecco's (Ca²⁺- und Mg²⁺-frei) gewaschen und die Lösung wieder abdekantiert. Anschließend wurden die Zellen mit 5-10 ml Trypsin/ EDTA- Lösung (0,05/0,02%) in der Kulturflasche gelöst und für zehn Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 40 ml des Nährmediums gemischt und mit 1400 rpm für eine Dauer von 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand im Röhrchen wurde verworfen, das gebildete Pellet hingegen in 5 ml Nährmedium resuspendiert. Abhängig von der vorherigen Zelldichte in der Kulturflasche wurden ca. 1-2 ml Pellet-Nährmedium Suspension in eine neue Kulturflasche überführt und 10-15 ml Nährmedium zugegeben. Die Kulturflasche wurde wieder im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und einer feuchten 5%igen CO₂-Atmosphäre angelegt.

2.2 Durchgeführte Untersuchungen

2.2.1. RNA-Extraktion

1. Gewebeaufarbeitung

Zur Extraktion der RNA aus dem entzündlichen Nierengewebe wurde ein Stück Gewebe von etwa 0,5cm³ Größe in einem sterilen Mörser zerkleinert und pulverfein unter Aufrechterhaltung der Temperatur mit Einsatz von flüssigem Stickstoff gemahlen. Das pulverfeine Gewebe wurde anschließend in ein Falcon - Röhrchen gegeben und mit 2-6 ml RNAzol, je nach Menge des zerkleinerten Gewebe möglichst bis zur Auflösung der Gewebeteilchen gemischt. Die Proben in den Röhrchen wurden stets auf Eis gelagert, und bei ca. +4°C verarbeitet. Nun wurde die Gewebe -RNAzol- Lösung bis zur vollständigen Auflösung des Gewebes mittels Vortex - Gerät 15 Minuten lang durchmischt. Danach wurde die Lösung auf 1,5 ml Eppendorf/ Sarstedt - Tubes mit Pipettus (2 ml Pipetten) aliquotiert. In jedes Röhrchen wurde 1 ml von der Lösung gegeben und wieder auf Eis gelagert. Nun wurde 120 µl Chloroform hinzugegeben und die Lösung milchig durchmischt. Um zwei getrennte Phasen zu erreichen, wurden die Röhrchen auf Eis für 10 Minuten gelagert. Für weitere 15 Minuten wurden die Röhrchen in der Sigma - Zentrifuge bei 16000g in Phasen getrennt. In der oberen wässrigen Phase befand sich die RNA in Lösung. In der unteren organischen Phase und in der Interphase befanden sich die DNA und Proteine. Die obere wässrige Phase wurde mit gestopfter 1000 µl Pipette ohne Interphase abgezogen und in ein neues Röhrchen überführt.

2. Erste Alkoholfällung

In jedes Röhrchen wurden 500 µl absolutes Isopropanol und 2,5 µl Glykogen hinzugegeben, und ausreichend durchmischt, um die RNA auszufällen. Die neue Lösung wurde anschließend für 60 Minuten bei -20 °C inkubiert. Die Lösungen wurden vor Weiterverarbeitung erst bei +4°C für 15 Minuten bei 16000g in der Zentrifuge getrennt. Nun war ein schwacher Bodensatz (Pellet) an der Röhrchenwand zu sehen. Der Überstand wurde dann mittels einer Injektionsnadel abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde mit 800 µl Ethanol (70 – 75%) gewaschen und vorsichtig abgelöst, anschließend bei +4°C für 8 Minuten wieder mittels Zentrifuge bei 8000g getrennt. Der Überstand wurde mit einer Injektionsnadel abgesogen und

das Pellet mit 100 µl TE -Puffer-Lösung bedeckt. Anschließend erfolgte die Inkubation der neuen Lösungen bei +70°C im Wärmeblock für 5 Minuten. Danach wurden 35 µl 3 M Natriumacetat, 1,5 µl Glykogen und 250 µl absolutes Ethanol hinzugegeben und durchmischt. Erneut wurde die Lösung bei –20°C für 30 Minuten inkubiert. Vor Weiterverarbeitung wurde die Lösung in der Zentrifuge für 15 Minuten getrennt, der Überstand abgesogen und zum austrocknen für 15 Minuten auf Eis gelagert. Schließlich wurde 30 µl TE -Puffer-Lösung hinzugegeben. Die Reinheitsbestimmung der RNA sowie ihre Quantifizierung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Um die Ausbeute und die Integrität der RNA nachzuweisen, wurden 2 µl der RNA mit 6 µl Sample loading buffer versetzt und für 5 Minuten bei 65°C im Thermocycler inkubiert. Die Proben wurden anschließend in einem 1%-igem Agarosegel im elektrischen Feld aufgetrennt. Proben mit degradierter RNA wurden verworfen.

2.2.2. RNA – Extraktion aus Paraffingewebe

Trennung des Gewebes von Paraffin:

Aus einem Paraffinblock wurden fünf Schnitte a 5 µm geschnitten, in ein kleines Röhrchen gegeben und mit 1 ml Xylol – Lösung überdeckt. Die Lösung wurde durchmischt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur gelagert, danach erfolgte die Trennung in der Zentrifuge bei 15000g und der Überstand wurde abgesaugt. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Nach der Xylolwaschung wurde 1 ml Ethanol (100%) auf den Bodensatz hinzugefügt, der anschließend wieder gut durchmischt und in der Zentrifuge getrennt wurde. Dieser Schritt wurde drei mal wiederholt. Der Überstand wurde nach der dritten Waschung abgesaugt und bei 56°C für 10 Minuten luftgetrocknet. Danach wurden 200 µl Lysierpuffer und 10 µl Proteinkinase K hinzugegeben. Die neue Lösung sollte gut durchmischt und bei 56°C für 90 Minuten inkubiert werden. Zu der Lösung gab man 1 ml Trizol und homogenisierte die Mischung mittels eines Ultraschallstabes. Die homogene Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

RNA-Extraktion:

Das vom Paraffin gelöste Gewebe wurde mit 200 µl Chloroform überdeckt, für 15 Sekunden geschüttelt und bei Raumtemperatur für 2 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Mischung bei +4°C und 15000 g für 15 Minuten gefällt. Die obere wässrige Phase wurde in neue Röhrchen überführt, mit 500µl Isopropylalkohol ergänzt, geschüttelt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Anschließend folgte die Trennung bei +4°C und 15000g für 10 Minuten. Der RNA-Bodensatz wurde nach Entfernen des Überstandes mit 1 ml Ethanol (75%) durchmischt und erneut bei 10000 g für 5 Minuten bei +4°C getrennt. Danach wurde dem Bodensatz 20 µl RNA- Resuspension - Solution hinzugegeben und vorsichtig durchmischt. Die neue Lösung wurde zu weiteren Verarbeitung bei +4°C gelagert.

2.2.3. Verarbeitung des Sammelurins

Für die Bestimmung von Muc7 im Urin wurden insgesamt 30 Proben ausgewertet. In Tabelle 7 und 8 ist eine Übersicht der Patienten dargestellt.

Die Spontanurinproben mit einer Menge von 200-500 ml wurden von Patienten bei stationärer Aufnahme in 100-500 ml gesammelt und in 500 ml Sarstedt- Flaschen aufbewahrt. Zur Vermeidung von RNA-Degradation wurden die Urinproben innerhalb von 60 Minuten weiterverarbeitet. Im ersten Arbeitsschritt wurden die Urinproben auf 50-ml-Falcontubes aliquotiert und für fünf Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Das verbliebene Zellpellet wurde in 10-20 ml PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde erneut bei einer Drehzahl von 3000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das verbliebene Zellmaterial wurde mit RNAzolTM vermischt und zu Mengen von ca. 1 ml auf 1,5 ml- Caps verteilt. Die RNAzol-Zellsuspension konnte für weitere RNA-Isolierung direkt verwendet oder die Proben bei -80 °C archiviert werden. Die RNA-Extraktion aus den Urinproben wurde wie bereits unter 2.2.1. beschrieben durchgeführt.

2.2.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Verdünnungen: 1:250 (1 ml DNA + 249 ml TE-Puffer)

1:500 (1ml DNA + 499 ml TE-Puffer)

Wellenlängen: $\lambda = 260$ und 280 nm, der Quotient A_{260} / A_{280} sollte annähernd 1,8 ergeben (dieser Wert zeigt hochaufgereinigte DNA an).

Konzentrationsbestimmung: Vergleichswert $OD_{260}=1$ entspricht 50 mg/ ml ds DNA

2.3. Polymerase - Ketten - Reaktion

Die Methode der Polymerasekettenreaktion wurde 1986 von Kary Mullis beschrieben (MULLIS et al. 1986). Die Polymerasekettenreaktion dient der exponentiellen Vervielfachung von DNA-Abschnitten durch den Einsatz sequenzspezifischer Startermoleküle, genannt Primer, und einer thermostabilen DNA- Polymerase. Die Sensitivität dieses Verfahrens kann noch erhöht werden, indem ein PCR-Produkt in eine zweite PCR eingesetzt wird. Ist das Primerpaar für die zweite PCR nicht mit dem der ersten Reaktion identisch und bindet es innerhalb des PCR-Produktes aus der ersten Reaktion, bezeichnet man diese als „nested PCR“.

Der PCR-Prozeß besteht aus 15-30 Wiederholungen eines Zyklus, der aus folgenden Schritten besteht:

1. Denaturierung (Melting): Erhitzen auf 94°C , um die Doppelstrang-DNA in zwei einzelne Stränge zu teilen. Sie bilden die Matrizen für die Primer und die DNA-Polymerase.
2. Anlagerung (Annealing): Zur Anlagerung der Primer an das Template (Einzelstrang DNA) muß die Temperatur gesenkt werden. Die Temperatur sollte der sogenannten Schmelztemperatur des Primers entsprechen. Die Annealing- Temperatur bestimmt die Spezifität einer PCR. Die Temperatur und Dauer der Behandlung hängen von den zu amplifizierenden Abschnitten ab.
3. Elongation: Bei ca. 72°C kann die Polymerase den Primer verlängern. Hier wird wieder die Temperatur soweit angehoben, damit die hitzestabile Taq- Polymerase die DNA-Synthese durchführen kann.

Bei jedem Zyklus kommt es so zu einer Verdopplung des genetischen Materials. Nach der Bildung neuer komplementärer Einzelstränge startet ein weiterer neuer Zyklus. Beginnend mit einer Temperatur von 94°C wird die neu gebildete doppelsträngige DNA wieder in komplementäre Einzelstränge gespalten. Anschließend können bei einer Annealing-Temperatur zwischen 37°C und 65°C erneut Primer an Einzelstränge anlagern. Diese Kettenreaktion sorgt dafür, dass neu synthetisierte DNA nach der Spaltung sofort wieder Ziele für Primer-Anlagerungen bietet und somit eine Amplifikation gewährleistet. Nach 20 Zyklen ergibt sich theoretisch eine 10^6 – fache Amplifizierung eines DNA-Moleküls. Das amplifizierte DNA-Material kann zur weiteren Analyse verwendet werden.

2.3.1. Reverse- Transkriptase - Vorbereitung

Die Reverse Transkriptase Reaktion ist eine sensitive Methode für den Nachweis von mRNA. Sie wird zur Rekonstruktion von cDNA verwendet. cDNA entsteht durch die Synthese von DNA aus mRNA, also einem Prozeß, der umgekehrt (revers) läuft wie die natürlicherweise stattfindende Synthese von mRNA zu DNA (Transkription). Während die DNA höherer Organismen in der Regel nicht kodierende Einschübe (Introns) enthalten, sind diese Introns in der cDNA nicht mehr vorhanden, da sie bereits in der mRNA ausgespart sind.

Die Methode enthält zwei Schritte, die erstens die Synthese von stabiler cDNA aus mRNA und anschließend die Herstellung der gewünschten spezifischen Sequenz der DNA mittels Polymerase Kettenreaktion gewährleistet.

Die Reverse - Transkriptase Vorbereitung erfolgt bei +4°C. Es werden jeweils zwei RNase freie Röhrchen á 1,5 ml beschriftet mit „RT +“ und „RT –“. Weitere Röhrchen werden nach Patientennummern beschriftet und mit der RT-Mischung befüllt. Für die RT-Mischung benötigt man: H₂O, 5 x Puffer (First strand), DTT 0,1 M /l, dNTPs 2,5 mM/ l (2,5 mM je dATP, dGTP, dCTP, dTTP bei neutralem pH-Wert), Primer: Random Hexamers 50 µM/l, RNase- Inhibitor 20 U/ µl, Superscript (200 U/ µl) nur in RT + Mischung hinzufügen.

Bei der Herstellung der Proben wird die doppelte Menge an RT- und die dreifache Menge an RT+ hergestellt. Die gewonnene RNA wurde zunächst in cDNA umgeschrieben. Dafür mischt man 2 µl RNA mit 10 µl sterilem Aqua dest. und denaturiert das Gemisch für 10 Minuten und kühlt bei +4°C. Anschließend wurden 4 µl First-Strand-Puffer, 0,4 µl Dithiothreitol, 1,0 µl dNTP's, 1,0 µl Random Hexamers, 1 µl RNase-Inhibitor und 1µl Reverse Transkriptase zugefügt. Die reverse Transkription erfolgte im Thermocycler für 10 Minuten bei +24°C und 60 Minuten bei +42°C. Anschließend wurde reverse Transkriptase drei Minuten lang bei +94°C

inaktiviert und die Proben auf +4°C wieder abgekühlt. Die erhaltenen cDNA- Proben wurden auf Eis bis zur Weiterverarbeitung oder bei –20°C über Nacht gelagert.

Tabelle 9: RT-Mischung (für 6 Proben, eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle)

| | | RT+ | RT- |
|------------------|---------------|----------------------------|----------------------------|
| H ₂ O | | 9x 1,6 µl = 14,4 µl | 2x 2,6 µl = 5,2 µl |
| 5x Puffer | First strand: | 9x 4,0 µl = 36,0 µl | 2x 4,0 µl = 8,0 µl |
| DTT | 0,1 M /l | 9x 0,4 µl = 3,6 µl | 2x 0,4 µl = 0,8 µl |
| dNTPs | 2,5 mM /l | 9x 1,0 µl = 9,0 µl | 2x 1,0 µl = 2,0 µl |
| Random | | | |
| Hexamers | 50 µM /l | 9x 1,0 µl = 9,0 µl | 2x 1,0 µl = 2,0 µl |
| RNAse | | | |
| Inhibitor | 20 U /µl | 9x 1,0 µl = 9,0 µl | 2x 1,0 µl = 2,0 µl |
| Superscript | 200 U / µl | 9x 1,0 µl = 9,0 µl | ----- |
| Gesamt: | | 9x 10,0 µl= 90,0 µl | 2x 10,0 µl= 20,0 µl |

(RT+ : Anzahl der Proben + 1x Zelllinie + 2x Sicherheit; RT- : 1x Zelllinie + 1x Sicherheit)

2.3.2. Mischung für die Herstellung der externen PCR

Für die externe Muc7-PCR wurden 20 µl cDNA- Probe mit 30 µl Reaktionsgemisch, wie unten in Tabelle 11 aufgeführt, versetzt. Die Amplifikation erfolgte im PCR-Block nach vorgegebenem Temperatur-Zeit-Profil (Tabelle 10).

Tabelle 10: Temperatur-Zeit-Profil für Muc7-PCR

| Schritt | Denaturierungs- temperatur/t | Primerbindungs- temperatur/t | Amplifikations- temperatur/t | Anzahl der Zyklen |
|---------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| 1 | 94°C/ 2 min | 61°C/ 1 min | 72°C/ 2 min | 1 |
| 2 | 94°C/ 1 min | 60°C/ 1 min | 72°C/ 2 min | 1 |
| 3 | 94°C/ 1 min | 59°C/ 1 min | 72°C/ 2 min | 1 |
| 4 | 94°C/ 1 min | 58°C/ 1 min | 72°C/ 2 min | 1 |
| 5 | 94°C/ 1 min | 57°C/ 1 min | 72°C/ 2 min | 1 |
| 6 | 94°C/ 1 min | 56°C/ 1 min | 72°C/ 2 min | 29 |

Anzahl der Proben + 2x Zelllinie + 2x „Sicherheit“ $\Rightarrow 6+2+2=10$

Tabelle 11: Externe PCR Mischung

| | | |
|--------------------------|------------------|-------------------------------|
| H ₂ O: | | 10x 24,8 µl = 248,0µl |
| 10 x Tricine: | | 10x 3,0 µl = 30,0 µl |
| dNTPs: | (2,5 mM / l): | 10x 1,0 µl = 10,0 µl |
| Extern Primer Sense | (15 µM / 1 Lsg): | 10x 0,5 µl = 5,0 µl |
| Extern Primer Anti-Sense | (15 µM / 1 Lsg): | 10x 0,5 µl = 5,0 µl |
| Taq-Polymerase | (5 U/ µl): | 10x 0,2 µl = 2,0 µl |
| Gesamt: | | 10x 30,0 µl = 300,0 µl |

2.3.3. Herstellung der internen PCR:

Hier wurde der PCR-Primer und die Mischung für das Housekeeping- Gene GAPDH getrennt hergestellt. Die Amplifikation erfolgte nach dem gleichen Temperatur- Zeitprofil wie bei der externen Muc7-PCR.

Jeweils Anzahl der Proben + 2x Zelllinie + 2x Sicherheit $\Rightarrow 6 + 2 + 2 = 10$

Tabelle 12: Interne PCR-Mischung

| | | |
|---------------------------|------------------|------------------------|
| H ₂ O: | | 10x 41,9 µl = 419,0 µl |
| 10x Tricine: | | 10x 4,9 µl = 49,0 µl |
| dNTPs: | (2,5 mM/l Lsg) : | 10x 1,0 µl = 10,0 µl |
| Intern Primer Sense: | (15 µM/l Lsg) : | 10x 0,5 µl = 5,0 µl |
| Intern Primer Anti-Sense: | (15 µM/l Lsg) : | 10x 0,5 µl = 5,0 µl |
| Taq-Polymerase: | (5U / µl): | 10x 0,2 µl = 2,0 µl |
| Gesamt: | | 10x 49,0 µl = 490,0 µl |

2.4. Durchführung der Muc 7 spezifischen nested- PCR

Für die externe Reaktion der spezifischen Muc 7- PCR wurden 20 µl der cDNA- Probe und 30µl des Extern-Reaktionsgemisches (s.o.: 2.3.2, Tab.11) verwendet. Die Amplifikation erfolgte nach dem Temperatur-Zeit-Profil, wie in Tabelle 10 aufgeführt.

Für jede Probe wurden 3 µl 10x-Tricine-Puffer, 1 µl Desoxynukleotid -Triphosphat- Mix (dNTP's, 2,5 mM/l), 0,5 µl Muc7 Extern-Sense- Primer (15 µM / l Lösung), 0,2 µl T-DNA-Polymerase (5 U /µl) mit 24,8 µl RNase- freiem H₂O vermischt. Die Basenpaargröße des externen Muc7 Produktes beträgt 439 bp. Für die zweite, interne PCR- Reaktion wurde folgender Reaktionsansatz wie in Tabelle 12 aufgeführt vermischt. Das Temperatur- Zeitprofil der internen PCR war mit dem externen Muc7-PCR Protokoll identisch (Tabelle 10). Die Größe der Basenpaare des internen Muc7 Produktes umfasst 348 bp. Die Primer für das Muc7- Gen sind jeweils in Tabelle 3 aufgeführt.

2.4.1. GAPDH- Lösung

(Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase)

Tabelle 13: GAPDH- Mischung

| | |
|-------------------------|---------------------------------------|
| H ₂ O: | 12x 42,4 µl = 424,0 |
| 10x Tricine: | 12x 4,9 µl = 49,0 µl |
| dNTPs: | (2,5 mM/l Lsg): 12x 1,0 µl = 10,0 µl |
| Primer GAPDH Sense | (20 µM / l Lsg): 10x 0,25 µl = 2,5 µl |
| Primer GAPDH Anti-Sense | (20 µM / l Lsg): 10x 0,25 µl = 2,5 µl |
| Taq-Polymerase: | (5 U / µl): 10x 0,2 µl = 2,0 µl |
| Gesamt: | 10x 49,0 µl = 490,0 µl |

Um eine Kontrolle der internen PCR sicherzustellen wurde parallel eine spezifische PCR mit dem Enzym Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase durchgeführt. Das GAPDH- Gen wird als sog. Housekeeping- Gen in allen humanen Zellen konstitutiv exprimiert. Die Amplifikation erfolgte im PCR-Block nach dem gleichen Temperatur-Zeitprofil wie für die interne Muc7-PCR. Der Reaktionsansatz für die GAPDH ist in Tabelle 13 aufgeführt. Die Primer für die externe und interne PCR sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Das GAPDH Produkt ergab ein Fragment mit einer Länge von 359 bp. Bei der Beurteilung der Ergebnisse bewies ein positives GAPDH Signal, dass die RNA korrekt von der cDNA umgeschrieben und die PCR richtig durchgeführt wurde.

2.5. Darstellung der PCR-Produkte

Mittels der Gelelektrophorese konnte die Darstellung der PCR-Produkte erfolgen. Hierbei wurden die PCR-Produkte mit Probenpuffer (loading dye solution) versetzt und in einem

2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Während der Elektrophorese wurde über den Kathodenpuffer Ethidiumbromid in das Gel infiltriert, so dass eine Darstellung der PCR-Produkte durch Interkallierung von Ethidiumbromid und der DNA unter UV-Licht ermöglicht wurde. Das Molekulargewicht der sichtbaren Banden wurde mit Hilfe eines molekularen DNA-Größenmarkers (100 bp DNA Ladder) bestimmt.

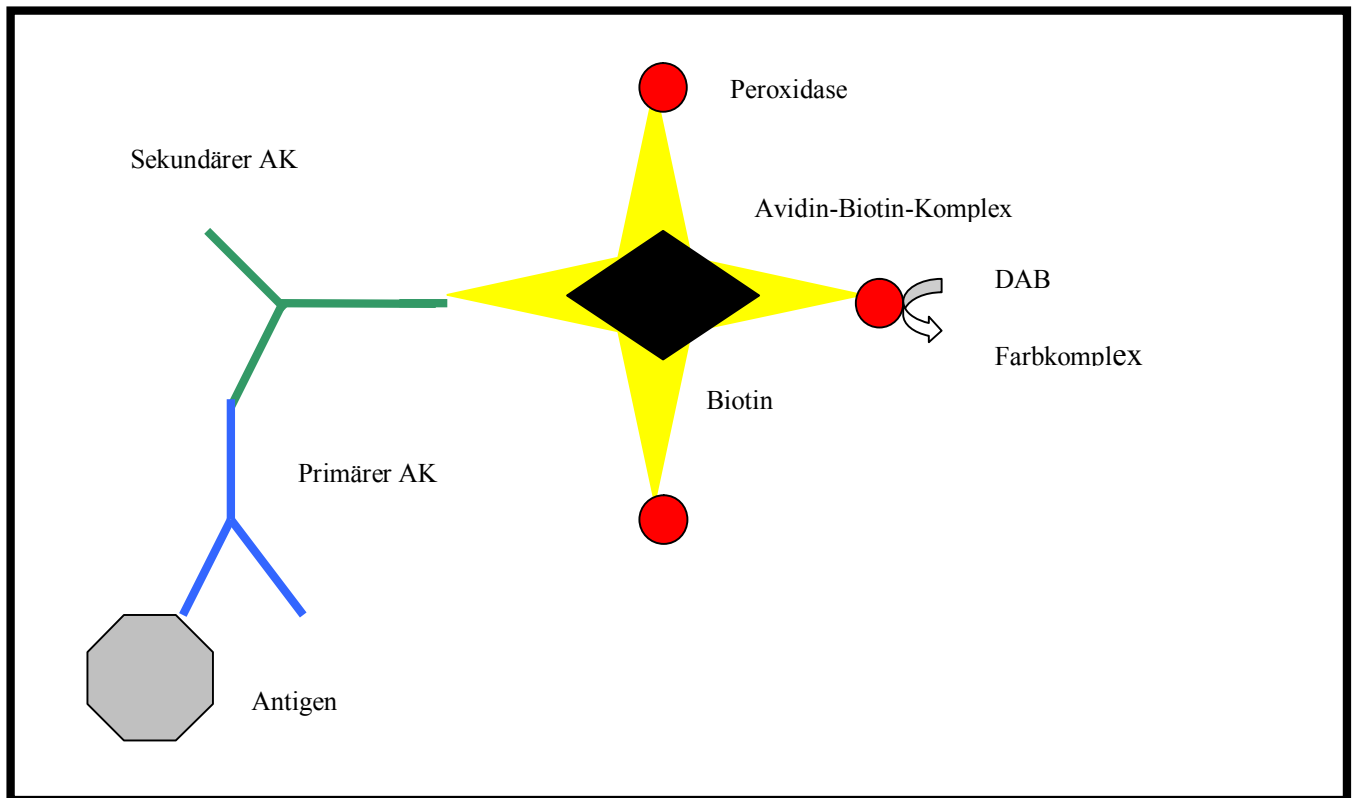
2.6. Sequenzierung der PCR- Produkte

Repräsentative Fragmente der spezifischen Muc 7 nested RT- PCR wurden aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und mit dem QIAEX II Gel Extraktions- Kit extrahiert. Exemplarisch wurden einige der isolierten cDNA Produkte in der Klinik für Dermatologie der Christian-Albrechts- Universität zu Kiel (mit freundlicher Unterstützung von Dr. J. Harder) sequenziert (ALFexpress, Fa Pharmacia, Freiburg, Germany).

2.7. Immunhistochemie

Mit Hilfe von Immunhistochemie / Immunzytochemie lassen sich in Geweben oder auf Einzelzellen entsprechende Zielstrukturen (Antigene) spezifisch nachweisen.

Abbildung 4: Prinzip der indirekten Immunfärbung (modifiziert nach Boenisch 1989)



2.7.1. Erstellung von Paraffinschnitten

Die Paraffinschnitte wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotom (RM 2145 der Firma Leica) mit einer Dicke von 3 bis 5 μm erstellt und auf Adhäsionsobjektträger aufgezogen. Nach dem Aufziehen der Schnitte und deren Trocknung bei Raumtemperatur wurden die Objektträger für mindestens 6 h bei 37°C inkubiert.

2.7.2. Das Prinzip der Immunhistochemie

Die Antigen-Demaskierung erfolgt je nach Antikörper mit unterschiedlichen Methoden. Gebräuchliche Methoden sind:

- Proteolytischer Verdau mit Trypsin, Pronase o.ä.
- Kochen der Schnitte im Dampfdrucktopf, Dampfgarer, Autoklaven oder in der Mikrowelle,

- Erhitzen in TUF (target unmasking fluid).

Als primäre Antikörper werden heutzutage im wesentlichen monoklonale Antikörper verwendet. Nachdem der primäre Antikörper an das Antigen im Schnitt gebunden ist, wird er mit einem Sekundärantikörper markiert. Der Sekundärantikörper ist gegen Immunglobuline von Mäusen oder Kaninchen gerichtet und kann so für verschiedene Primärantikörper verwendet werden. Je nach Nachweisverfahren kann der Sekundärantikörper chemisch modifiziert sein. Wir verwendeten hierbei die ABC-(Avidin-Biotin-Komplex-) Methode.

Die ABC- Methode ist eine enzymatische Methode, bei der das Antigen durch eine Farbreaktion dargestellt wird. Bei der ABC-Methode wird die ausgesprochen starke Bindung zwischen Biotin und Streptavidin ausgenutzt. Biotin ist ein kleines Molekül, das einem Vitamin aus der B-Gruppe entspricht. Avidin ist ein kleines Protein, das vier Bindungsstellen für Biotin besitzt, von denen aber nur zwei besetzt werden können. Aus einem biotinylierten Enzym (Meerrettich-Peroxidase) und Avidin werden große dreidimensionale Komplexe gebildet, die über freie Bindungsstellen des Avidin an Biotin-Gruppen des Sekundärantikörpers binden können. So werden pro gebundenem Primärantikörper viele Enzymmoleküle am Schnitt gekoppelt.

Diese Indikatorreaktion wird durch eine an einen Avidin-Biotin-Komplex gekoppelte Peroxidase katalysiert, welche Diaminobenzidin (DAB) in einen braunen Farbkomplex überführt. Der Proteinnachweis von MUC7 erfolgte mit Hilfe des Vectastain ABC-Kit und ist in Abb.4 schematisch dargestellt.

2.7.3. Vorbehandlung der Paraffinschnitte

Für die Immunhistochemie wurden die 5µm dicken Paraffinschnitte zunächst in Xylol (2 x 15 Minuten) entparaffiniert und dann in der absteigenden Alkoholreihe rehydriert (je 2x eine Minute in absolutem, 95%igem, 70%igem Ethanol spülen und anschließend für 2 Minuten in Aqua dest. wässern).

Für den MUC7-Nachweis war eine Demaskierung der Proteine erforderlich, was durch 2-minütiges Kochen der Präparate im Dampfdrucktopf in 1 Liter Zitratpuffer (2.1 g Zitrat in 1 Liter Aqua dest bei pH 6) auf höchster Druckstufe erreicht wurde. Die endogene Peroxidase wurde mittels 0,5%igem Wasserstoffperoxid blockiert und unspezifische Bindungsstellen mit

5%igem Normalserum abgesättigt. Zur Vermeidung einer unspezifischen Hintergrundfärbung, die durch die Anlagerung der Antikörper an stark geladene Kollagen- und Bindegewebelemente entstehen kann, wurden die Präparate für 20 Minuten mit dem Präimmunserum aus dem ABC-Kit inkubiert. Das Präimmunserum stammt von der Tierspezies, in welcher der Sekundärantikörper gebildet wurde (in diesem Falle Maus). Dieses Präimmunserum ist eine neutrale Proteinlösung, die sich an die geladenen Gewebsstrukturen anlagert und so verhindert, daß es zu einer unspezifischen Antikörperbindung kommt (Bourne, 1983). Endogene Avidin- und Biotinbindungsaktivitäten wurden durch die 15-minütige Inkubation mit der Avidinlösung und der Biotinlösung aus dem Avidin-Biotin-Blocking-Kit gehemmt.

2.7.4. Inkubation mit primären und sekundären Antikörper

Die Schnitte wurden mit unverdünntem monoklonalem MUC7 Antikörper PANH3 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (PANH3 wurde freundlicherweise von P.A. Clausen, Zahnmedizinische Abteilung der Universität Kopenhagen, Dänemark, zur Verfügung gestellt). Die Inkubation des primären MUC7-Antikörpers PANH3 erfolgte über Nacht. Der Antikörper wurde unverdünnt aufgetragen. Nach mehreren Waschschritten mit PBS wurden die Schnitte mit einem biotinylierten Anti-Maus IgG (Dako, Hamburg) sowie einem mit Streptavidin biotinylierten Peroxidase Komplex (Vector Laboratories, Burlingame, USA) inkubiert.

2.7.5. Indikatorreaktion

Es folgte die Bindung des Peroxidase-gekoppelten Avidin-Biotin-Komplexes des Vectastain-Kits an das Biotin des sekundären Antikörpers für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Peroxidase Aktivität wurde durch Einsatz von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Vector Laboratories, Burlingame, USA) und 0,2% Wasserstoffperoxid nach 4 Minuten detektiert. DAB dient als Enzymsubstrat, welches durch die Reaktion mit der Peroxidase einen braunen Farbkomplex bildet. Der Farbkomplex präzipitiert dort, wo sich das gesuchte Antigen befindet. Die Reaktion wurde optisch kontrolliert und bei ausreichender Färbung durch Waschen mit PBS-Puffer abgebrochen.

2.7.6. Kernfärbung

Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin (Merck, Darmstadt, Germany) gegengefärbt. Zur Stabilisierung der Kernfärbung wurden die Präparate für 5 bis 10 Minuten in Leitungswasser gespült. In der aufsteigenden Alkoholreihe (je 2x 1 Minute in 70%igem, 95%igem, absolutem Ethanol und Spülen in Xylol) wurden die Präparate entwässert und anschließend mit Pertex eingedeckt.

2.7.7. Kontrollen für die Immunhistochemie

Negative Kontrollen wurden durch das Ersetzen des primären Antikörpers mit einem IgG-„gematchten“ Isotypen Antikörper durchgeführt. Die zytoplasmatische Färbintensität in den Nieren wurde verglichen mit denen in epithelialen Zellen der Glandula submandibularis, die als MUC7 Positivkontrolle eingesetzt wurde. In einer Subpopulation der serösen Drüsen dieser Speicheldrüse wird MUC7 konstitutionell exprimiert (BOBEK et al. 1996). Die Proben wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Udo Kellner, Institut für Pathologie der Christian-Albrechts Universität zu Kiel. (Abb. 7a und 7b)

2.7.8. Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die Auswertung der immunhistochemischen Schnitte erfolgte nach dem semiquantitativen Verfahren nach Remmele und Stegner (REMMELE and STEGNER 1987). In den Präparaten mit normalem Nierengewebe erfolgte eine histomorphologische Differenzierung der Nierentubuli in Hauptstück, Überleitungsstück, Mittelstück und Sammelrohr. In den Präparaten mit pyelonephritischem Anteil wurde nach Durchsicht des gesamten Präparates der prozentuale Anteil der positiven Zellen bestimmt. Gemäß des Anteils der immunhistochemisch positiven Zellen wurden die Präparate in Anlehnung an Remmele in vier Gruppen eingeteilt:

- Gruppe 1: 0-25% positive Zellen
- Gruppe 2: 26-50% positive Zellen
- Gruppe 3: 51-75% positive Zellen
- Gruppe 4: 76-100% positive Zellen

Der prozentuale Anzahl der positiven Zellen (PP) und die Färbeintensität (Staining intensity) wurden subjektiv geschätzt. Die Färbung wurde als positiv bewertet, wenn ein Minimum von 20% der Zellen mit einer positiven Expression beurteilt wurde. Zum Nachweis der Spezifität der Färbung dienten Negativkontrollen, bei denen die Präparate, mit Präimmunserum bzw. anstatt mit PANH3 mit PBS-Puffer inkubiert wurden.

2.8. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Gen-Expressionunterschiede von Muc7 in den Frischgewebe- sowie Urinproben wurde mittels des Fisher-Tests (Vierfeldertafel) durch das Computerprogramm BIAS Version 8.1 (Biometrische Analyse von Stichpunkten, epsilon Verlag, Frankfurt) durchgeführt.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression von Muzin Muc7 in bakteriell entzündeten Nierengeweben sowie in Urinproben von Patienten mit akuter Pyelonephritis im Vergleich zu Normalproben qualitativ mit Hilfe der nested RT-PCR untersucht. Wir haben uns mit der Frage beschäftigt, ob eine erhöhte Muzinexpression durch eine Entzündung induziert werden kann.

3.1. GAPDH- RT- PCR

Der Nachweis von GAPDH Genexpression mit einem Produkt von 359 bp war in allen beschriebenen Untersuchungsproben aus Frischgeweben und Urinen positiv (Abb. 5 und Abb. 6). Sie diente als Nachweis für die erfolgreiche cDNA Synthese der RT-PCR.

Allerdings zeigte die GAPDH - RT-PCR nach Extraktion von paraffinisiertem Urogenitalgewebe kein positives Signal.

3.2. Kontrollen

Als Positivkontrolle für die Amplifikation des MUC7-Gens diente cDNA aus der Harnblasenkarzinomzelllinie RT-4. In allen Versuchsansätzen zeigte die Blasenkarzinom-Zelllinie RT-4 als Positivkontrolle ein MUC7-Amplifikationsprodukt von 348 bp. Parallel erfolgten zu jeder durchgeführten PCR zwei Negativkontrollen (Tabelle 9). Es wurde im ersten Kontrollansatz statt mRNA steriles Wasser in den PCR-Ansatz eingesetzt. Bei der zweiten Negativkontrolle wurde auf die Zugabe des Enzyms Reverse Transkriptase (Superscript) verzichtet. Damit konnte eine DNA- Kontamination der Proben ausgeschlossen werden.

3.3. Muc7-Genexpression in normalem Nierengewebe (Frischgewebe)

Nach unten aufgeführter Tabelle zeigen sämtliche Nieren-Normalgewebeproben, die aus zehn verschiedenen tumortragenden Nieren stammen, keine Muc7-Gen-Expression. In Abb. 5 ist eine Auswahl dieser Proben als „normale Niere“ ohne Amplifikationsprodukt dargestellt.

Tabelle 14: Expression von Muc7 in normalem Nierengewebe

| Nr.: | Alter | G | Probe | Indikation | GAPDH | Muc7- |
|------|-------|---|--------------|--------------------|-------|---------|
| | | | | Nephrektomie | | Gen |
| 1 | 47 | m | Normalgewebe | Nierenzellkarzinom | Ja | Negativ |
| 2 | 59 | w | Normalgewebe | Nierenzellkarzinom | Ja | Negativ |
| 3 | 61 | w | Normalgewebe | Nierenzellkarzinom | Ja | Negativ |
| 4 | 63 | m | Normalgewebe | Nierenzellkarzinom | Ja | Negativ |
| 5 | 67 | m | Normalgewebe | Nierenzellkarzinom | Ja | Negativ |
| 6 | 67 | m | Normalgewebe | Nierenzellkarzinom | Ja | Negativ |
| 7 | 68 | m | Normalgewebe | Nierenzellkarzinom | Ja | Negativ |
| 8 | 68 | m | Normalgewebe | Nierenzellkarzinom | Ja | Negativ |
| 9 | 71 | w | Normalgewebe | Nierenzellkarzinom | Ja | Negativ |
| 10 | 75 | w | Normalgewebe | Nierenzellkarzinom | Ja | Negativ |

3.4. Muc7-Genexpression in chronisch entzündetem Nierengewebe (Frischgewebe)

In 7/15 entzündlich veränderten Nierengeweben zeigte sich insgesamt eine schwach positive Expression von Muc 7. Bei den unten aufgeführten Proben wurde insgesamt dreimal pro Gewebe eine nested- PCR durchgeführt. Als positiv galt die Probe, die mindestens zweimal ein positives Signal zeigte.

Tabelle 15: Expression von Muc 7 in entzündlich verändertem Nierengewebe

| Nr.: | Alter | m/w | MUC7 | MG2 | Histologie |
|------|-------|-----|----------|--------------|---|
| | | | Gen-Expr | Protein-Expr | |
| 1 | 1 | m | + | - | Harnstauungsniere, Reflux bei Doppelnieren |
| 2 | 32 | m | - | - | Hydronephrose |
| 3 | 34 | w | - | - | Schrumpfnieren |
| 4 | 34 | m | + | + | Infizierte, funktionslose Harnstauungsniere |
| 5 | 50 | w | - | - | Harnstauungsniere |
| 6 | 53 | w | + | + | Schrumpfnieren |
| 7 | 60 | m | + | + | Chronische eitrige Nephritis |
| 8 | 63 | w | - | - | Harnstauungsniere |
| 9 | 64 | w | - | - | Pyelonephritis |
| 10 | 67 | m | - | - | Pyelonephritis |
| 11 | 67 | m | + | + | Chronische Pyelonephritis |
| 12 | 68 | w | - | - | Destruierende Pyelonephritis |

| | | | | | |
|----|----|---|---|---|--|
| 13 | 71 | w | + | + | Harnstauungsniere |
| 14 | 74 | m | + | + | Teilweise abszedierende Pyelonephritis |
| 15 | 75 | w | - | - | Destruierende Pyelonephritis |

3.5. Ergebnisse der Sammelurinproben

3.5.1. Muc7-Genexpression in Sammelurinproben von Patienten mit Harnwegsinfekt

Es wurden 15 Proben von Patienten mit positivem Urinsediment und Pyelonephritis auf Muc7 untersucht. Bei einem positiven Urinsediment war jeweils eine positive Bakteriurie und Leukozyturie nachweisbar. Bei 5 von 15 Patienten war ein Muc7-Amplifikationsprodukt zu detektieren.

Tabelle 16: Sammelurinproben von Patienten mit Harnwegsinfektion

| Lfd. Nr. | Pat. | Geschlecht | Alter | Muc7 |
|----------|------|------------|-------|---------|
| 1 | 549 | m | 67 | Positiv |
| 2 | 557 | w | 81 | Negativ |
| 3 | 566 | m | 61 | Positiv |
| 4 | 572 | m | 65 | Positiv |
| 5 | 596 | m | 70 | Negativ |
| 6 | 733 | w | 44 | Negativ |
| 7 | 738 | w | 77 | Negativ |
| 8 | 740 | m | 69 | Negativ |
| 9 | 760 | w | 48 | Negativ |
| 10 | 764 | m | 69 | Negativ |
| 11 | 765 | m | 75 | Negativ |
| 12 | 766 | m | 65 | Negativ |
| 13 | 774 | m | 43 | Negativ |
| 14 | 834 | w | 78 | Positiv |
| 15 | 855 | m | 49 | Positiv |

3.5.2. Muc7-Genexpression in Sammelurinproben von gesunden Probanden

Bei den gesunden Probanden waren von 15 Urinproben 2 mit positiver Muc7-Genexpression.

Tabelle 17: Sammelurin von Gesunden Probanden

| Lfd. Nr. | Pat. Nr. | Geschlecht | Alter | Muc7 |
|----------|----------|------------|-------|---------|
| 1 | 453 | m | 32 | Negativ |
| 2 | 477 | m | 30 | Positiv |
| 3 | 478 | m | 66 | Positiv |
| 4 | 583 | m | 80 | Negativ |
| 5 | 593 | m | 70 | Negativ |
| 6 | 598 | m | 69 | Negativ |
| 7 | 771 | w | 26 | Negativ |
| 8 | 848 | m | 33 | Negativ |
| 9 | 857 | m | 53 | Negativ |
| 10 | 859 | w | 23 | Negativ |
| 11 | 864 | m | 31 | Negativ |
| 12 | 928 | m | 63 | Negativ |
| 13 | 929 | w | 60 | Negativ |
| 14 | 934 | m | 33 | Negativ |
| 15 | 945 | w | 26 | Negativ |

Abbildung 5: Muc7-spezifische RT-PCR mit einem Amplifikationsprodukt von 348 bp bei einer Auswahl infizierter Nierengewebe. Im Vergleich zeigt sich bei Nieren Normalgewebe kein Amplifikationsprodukt. Das größere Fragment der Muc7-Doppelbande lässt eine Splice-Variante vermuten, die trotz wiederholter Sequenzierung nicht weiter differenzierbar war. Die internen Kontrollen der cDNA-Synthese wurden mittels GAPDH-RT-PCR mit einem Produkt von 359 bp durchgeführt und im unteren Bildabschnitt dargestellt. Die PCR-Proben wurden in einem 2% Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. (M entspricht dem Molekularmarker). Die RT+ reverse Transkriptase stellt die Positivkontrolle und die RT- reverse Transkriptase die Negativkontrolle dar.

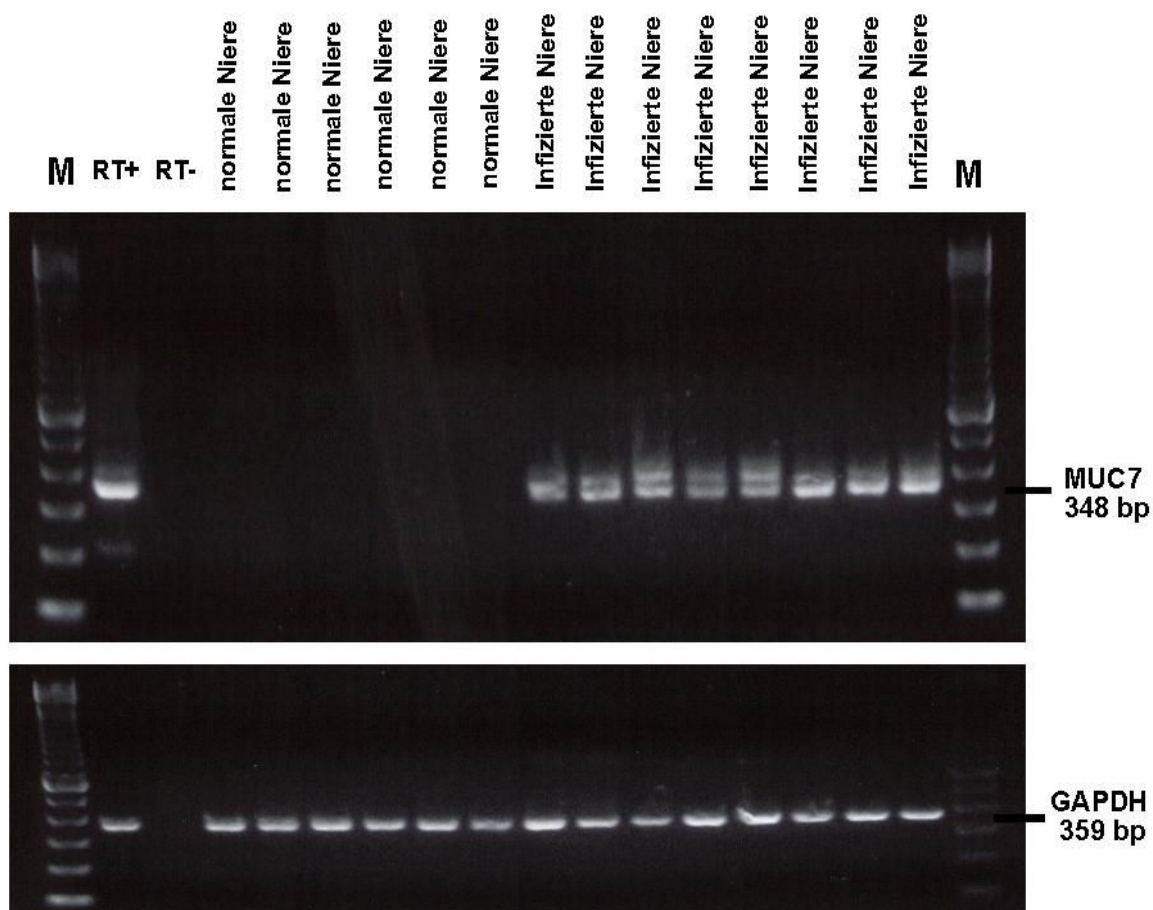
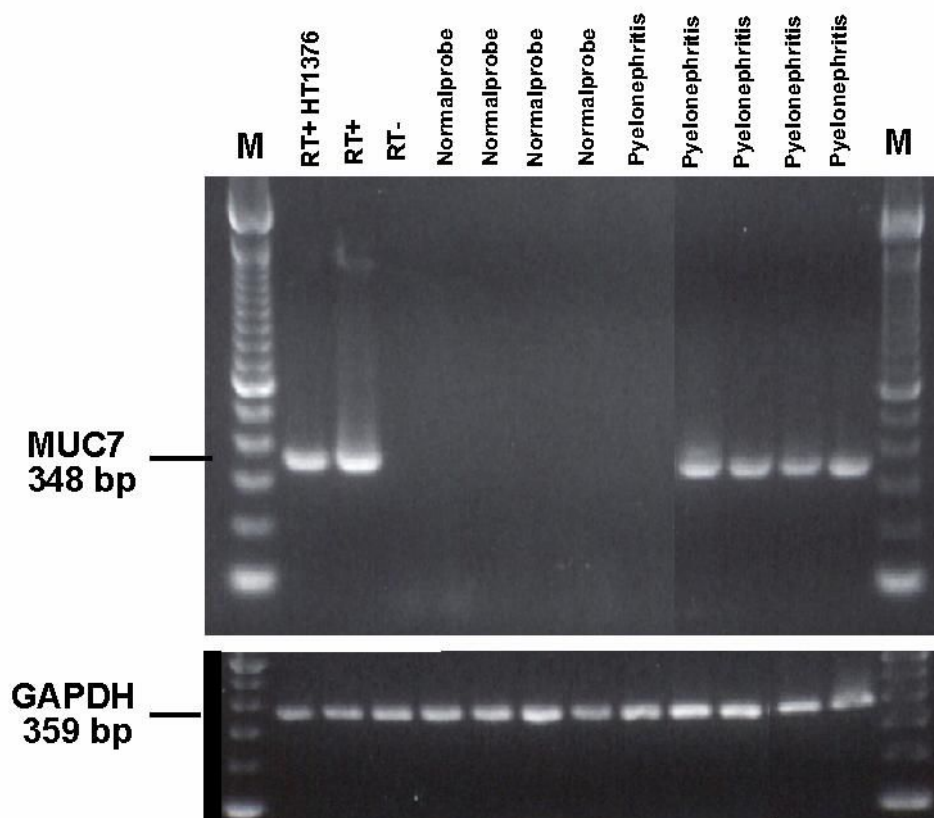


Abbildung 6: Muc7-spezifische RT-PCR mit einem Amplifikationsprodukt von 348 bp aus Urinproben der pyelonephritischen Proben im Vergleich zu Normalproben. Die internen Kontrollen der cDNA- Synthese wurden mittels GAPDH-RT-PCR mit einem Produkt von 359 bp durchgeführt und im unteren Bildabschnitt dargestellt. Die PCR-Proben wurden in einem 2% Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. (M entspricht dem Molekularmarker). Versuchsweise wurde die HT1376, eine G III (Histologischer Differenzierungsgrad III) Blasentumorzell-Linie der Frau als Positivkontrolle verwendet.



3.6. Immunlokalisation von MUC7 (MG2) in Nierengeweben

Die immunohistochemischen Untersuchungen wurden mit einem monoklonalen MUC7 Antikörper an 5µm dicken Schnitten aus Formalin-fixiertem paraffinisierten Gewebeproben untersucht. Die Ergebnisse aus pyelonephritisch veränderten Organen und normalem Nierengewebe von tumortragenden Organen wurde dabei verglichen.

Die Weißlicht- Mikroskopie zeigte eine MUC7 Proteinexpression in 6 von 15 untersuchten Nierengewebsproben mit pyelonephritischen Veränderungen (Tab. 15). In den immunpositiven Proben zeigten ca. 20 bis 30 Prozent der distalen Tubuli, sowie Henle' Schleifen und Sammelrohre eine positive Expression mit generell homogener zytoplasmatischer MUC7 Färbung (Abbildung 7C). Positiv gefärbte Strukturen waren verteilt über alle Abschnitte des Parenchyms (Rinde und Nierenbecken- nah) entsprechend Abbildung 7C. Grundsätzlich zeigten sich alle Glomerula und proximale Tubuluszellen negativ bezüglich einer MUC7 Immunfärbung (Abbildung 7 C mit zentraler Darstellung eines Glomerulums). Gewebeschnitte von normalem Nierengewebe zeigten keine Immunfärbung mit dem monoklonalen MUC7-Antikörper (Abbildung 7D).

Negative Kontrollen wurden durch das Ersetzen des primären Antikörpers mit einem IgG-gematchten Isotypenantikörper durchgeführt. Negativkontrollen, die mit Prä-immun Serum inkubiert wurden, zeigten keine Immunreaktion (Abbildung 7B).

Die zytoplasmatische Färbintensität in den Nieren wurde verglichen mit denen in epithelialen Zellen der Glandula submandibularis (Abbildung 7A), die als Muc7- Positivkontrolle eingesetzt wurde. Die Färbung wurde als positiv bewertet, wenn ein Minimum von 20% der Zellen mit einer positiven Expression beurteilt wurde.

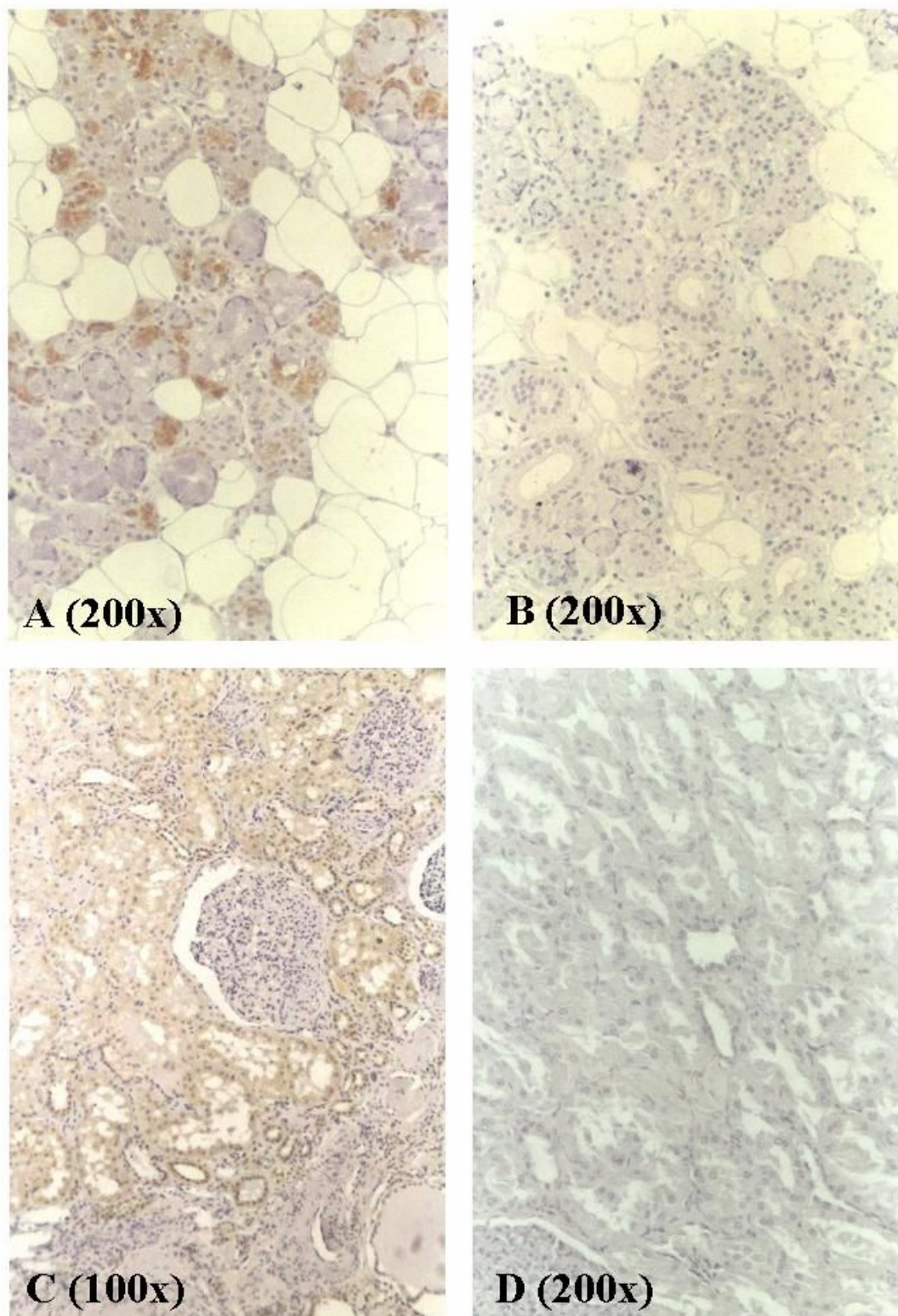


Abbildung 7: (A) Positivkontrolle und (B) Negativkontrolle der PANH3- Immunhistochemie an einer Glandula submandibularis- Normalgewebeprobe. (C) Positivkontrolle und (D) Negativkontrolle der PANH3- Immunhistochemie an Nierengewebe mit chronischer Pyelonephritis. 20 bis 30 Prozent der Präparate weisen im Bereich der distalen Tubuli, sowie

Henle' Schleifen und Sammelrohre eine positive Expression mit generell homogener zytoplasmatischer MUC7 Färbung auf. Die Auswertung erfolgte subjektiv in Anlehnung an REMMELE und STEGNER 1987 wie bereits unter 2.7.8 beschrieben.

4. Diskussion

Seit den 90er Jahren wurden Erkenntnisse über die Bedeutung von Muzinen für die Embryogenese, als Tumormarker oder in der Infektabwehr veröffentlicht. In den letzten Jahren wurde im Bereich der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Pulmonologie und der Gastroenterologie insbesondere die Expression von Muzinen in Verbindung mit bakteriellen Infektionen und Mykosen beleuchtet (KIRKBRIDE et al. 2001; ANDRIANIFAHANANA et al. 2001; COPIN et al. 2001).

Aufgrund einer allgemeinen Zunahme von Erregerresistenzen vor allem im stationären Behandlungsbereich kommt der Erforschung von antimikrobiell wirksamen Substanzen eine besondere Bedeutung zu. Insbesondere körpereigene antimikrobielle Substanzen erwecken die Hoffnung, dass sie in supraphysiologischer Konzentration nur eine geringe Nebenwirkungsrate und keine Resistenzentwicklung gegenüber Infektionserregern aufweisen.

Der Mechanismus für die toxische Wirkung des Muc7 Muzins ist dabei sowohl über eine mögliche Porenbildung in der Zellmembran als auch über eine intrazelluläre Wirkung bedingt. Um die Wirkungsweise der antimikrobiellen und antifungalen Aktivität des Muc7 weiter zu veranschaulichen wurde die antimikrobielle Potenz der aktiven Domäne des Muc7, ein rekombinantes Muc7 20-mer (N-LAHQKPFIRSKSYKCLHKRCR-C), näher untersucht. Bobek und Mitarbeiter haben dabei Vergleiche des rekombinierten Muc7 20-mers mit dem antimikrobiell wirksamen Histatin (Hsn-5) durchgeführt. Dabei konnte sowohl bei Pilzen als auch bei grampositiven und – negativen Bakterien eine antimikrobielle Potenz des Muzins festgestellt werden (BOBEK and SITU 2003). Der Vergleich des Muc7 20-mers mit Histatin zeigt, daß die fungizide Potenz des Histatins 5 gegen *Candida albicans* auf einer mitochondrialen Störung beruht. Die Wirkung des Muc7 20-mers hingegen läuft weder über metabolische intrazelluläre Vorgänge ab, noch unterliegt sie einer Temperaturabhängigkeit wie das Histatin. Gleichsam ist das Muc7 20-mer wie Histatin 5 im mikromolaren Konzentrationsbereich wirksam.

In der Arbeit von Liu aus dem Jahre 2000 wurde eine Agglutination zwischen der N-terminalen Region des Muzins Muc7 und dem Bindungsareal des *Streptokokkus mutans* nachgewiesen (LIU et al. 2000).

Kürzlich wurde von Retz und Mitarbeitern über die Bedeutung von Muc7 als potentieller Tumormarker im Urin zur Detektion eines Harnblasenkarzinoms berichtet (RETZ et al. 2003). In der Arbeit wurden sowohl Patienten mit verschiedenen Stadien eines Harnblasenkarzinoms als auch eine Kontrollgruppe von nicht Erkrankten und eine dritte Gruppe mit Harnwegsinfekt einem Screening bezüglich der Muc7-Expression unterzogen. Die Ergebnisse der durchgeführten Arbeit ergab eine hohe Sensitivität von 80% bei Patienten mit histologisch gesichertem Harnblasenkarzinom und einer Spezifität von 90% bei dem gesunden Kontrollkollektiv so wie eine Spezifität von 75% bei Patienten mit Harnwegsinfektionen. Mit einer positiven "likelihood ratio" von 3,3 handelte es sich hinsichtlich der Detektion von Harnblasenkarzinomen um einen qualitativ guten Test (JAESCHKE et al. 1994). Okegawa hat in seiner Arbeit zum Nachweis einer MUC7 Expression im Urin von Harnblasenkarzinom-Patienten bei zwei von 15 Probanden in der Kontrollgruppe einen positiven Nachweis von ebenfalls 15 gesehen, die nachweislich einen Harnwegsinfekt hatten ohne weiteren Nachweis einer Tumorgenese.

In diese Arbeit haben wir das Mucin Muc7 weiterführend im Hinblick auf die bakterielle Pyelonephritis untersucht. Der Nachweis einer Genexpression von Muc7 mit der nested-PCR hat sich in der Vergangenheit als etabliertes Verfahren bewährt (RETZ et al. 1998; OKEGAWA et al. 2003; JUMBLATT et al. 2003).

Auch in der aktuellen Literatur konnte kein Nachweis von Muc7 in normalem Nierengewebe verzeichnet werden. In dieser Arbeit haben wir die qualitative Genexpression von Muc7 in normalem Nierengewebe von tumortragenden Nieren und in Nieren mit einer chronischen Entzündung der Nieren nach chirurgischer Entfernung untersucht und diese miteinander verglichen. Dabei ergab sich eine signifikant häufigere Muc7 Expression in der Gruppe mit chronischen bakteriellen Entzündungen nach dem Fisher-Test ($p=0,022$).

Unsere Ergebnisse zeigen, daß in Nierennormalgeweben bei 10 Proben keine Expression des Muc7-Gens vorliegt. Im Gegensatz dazu zeigt sich eine positive Genexpression von Muc7 bei 7/15 ($p<0,05$) der entzündlich veränderten Nierengewebe signifikant erhöht im Vergleich zu den Normalgewebeproben. Hierzu gibt es in der Literatur keine aktuellen Daten.

Von 15 gesunden Urinproben war in zwei Fällen die Muc7 Expression nachweisbar. Im Vergleich dazu zeigten auch fünf pyelonephritische Urinproben von insgesamt 15 eine Muc7-Genexpression. Eine entzündliche Induktion der Genexpression ist daher schwer anzunehmen.

Die Schwierigkeit der Interpretation der RT-PCR Ergebnisse aus Urin- Exfoliativzellen liegt in der topographisch unklaren Herkunft von MUC7-positiven Zellen. Diese können sowohl aus renalem tubulärem Epithel als auch aus dem Übergangsepithel des oberen Harntraktes bzw. der Harnblase stammen. Bei den Patienten mit entzündlich verändertem Urin lag zumindest klinisch der Verdacht auf eine Pyelonephritis vor im Sinne von Flankenschmerzen in Ruhe bzw. provoziertem Druck- und Klopfschmerz bei der körperlichen Untersuchung.

Beim Nachweisversuch der Muzinexpression in Paraffingewebe erwies sich die übliche Extraktionsmethode als nicht ausreichend für die Generierung von RT-PCR fähiger RNA.

Schlussfolgernd konnte in dieser Arbeit eine RNA-Extraktion und letztendlich zuverlässige Aussage bezüglich einer Genexpression nur durch Extraktion der RNA aus frisch gewonnenem Material erzielt werden. Bereits paraffinisiertes Gewebe eignet sich nicht zur Weiterverarbeitung mittels PCR. Im Vergleich dazu ist die immunhistochemische Methode zum Nachweis der Proteinexpression von MG2 an Paraffin- eingebettetem Gewebe als vergleichende Methode sinnvoll und kann zur Bestätigung der Expression auf Proteinebene eingesetzt werden. Hier waren 6 von 15 Proben positiv ($p < 0,05$).

Die vorliegende Arbeit gibt Anstoß zu weiteren Untersuchungen hinsichtlich eines quantitativen Nachweises von Muc7 als Marker einer Entzündung im Urogenitaltrakt. Dabei kann aufgrund der vorliegenden Literaturdaten (BOBEK and SITU 2003) vermutet werden, dass es sich um Vorgänge der körpereigenen antimikrobiellen Abwehr handelt.

Funktionelle Untersuchungen durch proinflammatorische Stimulation von Zellkulturen z.B. durch Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-1 β oder Interferon- γ zur Induktion einer MUC7 Expression könnten hier weiteren Aufschluss bringen.

Aus unseren Untersuchungen ziehen wir den Schluss, dass in der bakteriellen Pyelonephritis regelmäßig eine Hochregulierung von MUC7 als Ausdruck einer körpereigenen Abwehr gegen infektiöse Organismen im Urogenitaltrakt stattfindet. Die Aufklärung der molekularen Mechanismen einer Induktion der MUC7 Gen- und Proteinexpression bleibt dabei weiteren Untersuchungen vorbehalten.

5. Literaturverzeichnis

1. Andrianifahanana M, Moniaux N, Schmied BM, Ringel J, Friess H, Hollingsworth MA, Buchler MW, Aubert JP, Batra SK (2001) Mucin (MUC) gene expression in human pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a potential role of MUC4 as a tumor marker of diagnostic significance. *Clin Cancer Res* 7: 4033-4040
2. Biesbrock AR, Reddy MS, Levine MJ (1991) Interaction of a salivary mucin-secretory immunoglobulin A complex with mucosal pathogens. *Infect Immun* 59: 3492-3497
3. Bobek LA, Liu J, Sait SN, Shows TB, Bobek YA, Levine MJ (1996) Structure and chromosomal localization of the human salivary mucin gene, MUC7. *Genomics* 31: 277-282
4. Bobek LA, Situ H (2003) MUC7 20-Mer: investigation of antimicrobial activity, secondary structure, and possible mechanism of antifungal action. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 643-652
5. Bobek LA, Tsai H, Biesbrock AR, Levine MJ (1993) Molecular cloning, sequence, and specificity of expression of the gene encoding the low molecular weight human salivary mucin (MUC7). *J Biol Chem* 268: 20563-20569
6. Boenisch, T. (1989): Färbemethoden. DAKO Corporation, Carpinteria, Kalifornien, USA
7. Bourne, J.A. (1983): Handbuch 1 der Immunperoxidase-Färbemethode. DAKO Corporation, Carpinteria, Kalifornien, USA
8. Buisine MP, Devisme L, Maunoury V, Deschodt E, Gosselin B, Copin MC, Aubert JP, Porchet N (2000) Developmental mucin gene expression in the gastroduodenal tract and accessory digestive glands. I. Stomach. A relationship to gastric carcinoma. *J Histochem Cytochem* 48: 1657-1666
9. Cohen RE, Aguirre A, Neiders ME, Levine MJ, Jones PC, Reddy MS, Haar JG (1991) Immunochemistry and immunogenicity of low molecular weight human salivary mucin. *Arch Oral Biol* 36: 347-356

10. Copin MC, Buisine MP, Devisme L, Leroy X, Escande F, Gosselin B, Aubert JP, Porchet N (2001) Normal respiratory mucosa, precursor lesions and lung carcinomas: differential expression of human mucin genes. *Front Biosci* 6:D1264-75.: D1264-D1275
11. Corrales RM, Calonge M, Herreras JM, Saez V, Chaves FJ (2003) Human epithelium from conjunctival impression cytology expresses MUC7 mucin gene. *Cornea* 22: 665-671
12. Groenink J, Ligtenberg AJ, Veerman EC, Bolscher JG, Nieuw Amerongen AV (1996) Interaction of the salivary low-molecular-weight mucin (MG2) with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70: 79-87
13. Gum JR, Byrd JC, Hicks JW, Toribara NW, Lamport DT, Kim YS (1989) Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism. *J Biol Chem* 264: 6480-6487
14. Higuchi T, Orita T, Nakanishi S, Katsuya K, Watanabe H, Yamasaki Y, Waga I, Nanayama T, Yamamoto Y, Munger W, Sun HW, Falk RJ, Jennette JC, Alcorta DA, Li H, Yamamoto T, Saito Y, Nakamura M (2004) Molecular cloning, genomic structure, and expression analysis of MUC20, a novel mucin protein, up-regulated in injured kidney. *J Biol Chem* 279: 1968-1979
15. Hoffman MP, Haidaris CG (1993) Analysis of *Candida albicans* adhesion to salivary mucin. *Infect Immun* 61: 1940-1949
16. Jaeschke R, Guyatt GH, Sackett DL (1994) Users' guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? The Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA* 271: 703-707
17. Jumblatt MM, McKenzie RW, Steele PS, Emberts CG, Jumblatt JE (2003) MUC7 expression in the human lacrimal gland and conjunctiva. *Cornea* 22: 41-45
18. Kirkbride HJ, Bolscher JG, Nazmi K, Vinall LE, Nash MW, Moss FM, Mitchell DM, Swallow DM (2001) Genetic polymorphism of MUC7: allele frequencies and association with asthma. *Eur J Hum Genet* 9: 347-354

19. Liu B, Rayment SA, Gyurko C, Oppenheim FG, Offner GD, Troxler RF (2000) The recombinant N-terminal region of human salivary mucin MG2 (MUC7) contains a binding domain for oral Streptococci and exhibits candidacidal activity. *Biochem J* 345 Pt 3:557-64.: 557-564
20. Mathoera RB, Kok DJ, Verduin CM, Nijman RJ (2002) Pathological and therapeutic significance of cellular invasion by *Proteus mirabilis* in an enterocystoplasty infection stone model. *Infect Immun* 70: 7022-7032
21. Mehrotra R, Thornton DJ, Sheehan JK (1998) Isolation and physical characterization of the MUC7 (MG2) mucin from saliva: evidence for self-association. *Biochem J* 334: 415-422
22. Moniaux N, Escande F, Porchet N, Aubert JP, Batra SK (2001) Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front Biosci* 6:D1192-206.: D1192-D1206
23. Moniaux N, Andrianifahanana M, Brand RE, Batra SK (2004) Multiple roles of mucins in pancreatic cancer, a lethal and challenging malignancy. *Br J Cancer* 91 (9): 1633-8
24. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-73
25. Murray PA, Prakobphol A, Lee T, Hoover CI, Fisher SJ (1992) Adherence of oral streptococci to salivary glycoproteins. *Infect Immun* 60: 31-38
26. Nielsen PA, Mandel U, Therkildsen MH, Clausen H (1996) Differential expression of human high-molecular-weight salivary mucin (MG1) and low-molecular-weight salivary mucin (MG2). *J Dent Res* 75: 1820-1826
27. Okegawa T, Kinjo M, Horie S, Nutahara K, Higashihara E (2003) Detection of mucin 7 gene expression in exfoliated cells in urine from patients with bladder tumor. *Urology* 62: 182-186
28. Pallesen LT, Berglund L, Rasmussen LK, Petersen TE, Rasmussen JT (2002) Isolation and characterization of MUC15, a novel cell membrane-associated mucin. *Eur J Biochem* 269: 2755-2763

29. Ramasubbu N, Reddy MS, Bergey EJ, Haraszthy GG, Soni SD, Levine MJ (1991) Large-scale purification and characterization of the major phosphoproteins and mucins of human submandibular-sublingual saliva. *Biochem J* 280: 341-352
30. Reddy MS, Levine MJ, Paranchych W (1993) Low-molecular-mass human salivary mucin, MG2: structure and binding of *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Rev Oral Biol Med* 4: 315-323
31. Remmele W, Stegner HE (1987) [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologie* 8: 138-140
32. Retz M, Lehmann J, Amann E, Wullich B, Roder C, Stockle M (2003) Mucin 7 and cytokeratin 20 as new diagnostic urinary markers for bladder tumor. *J Urol* 169: 86-89
33. Retz M, Lehmann J, Roder C, Plotz B, Harder J, Eggers J, Pauluschke J, Kalthoff H, Stockle M (1998) Differential mucin MUC7 gene expression in invasive bladder carcinoma in contrast to uniform MUC1 and MUC2 gene expression in both normal urothelium and bladder carcinoma. *Cancer Res* 58: 5662-5666
34. Shankar V, Gilmore MS, Elkins RC, Sachdev GP (1994) A novel human airway mucin cDNA encodes a protein with unique tandem-repeat organization. *Biochem J* 300: 295-298
35. Situ H, Wei G, Smith CJ, Mashhoon S, Bobek LA (2003) Human salivary MUC7 mucin peptides: effect of size, charge and cysteine residues on antifungal activity. *Biochem J* 375: 175-182
36. Singh AP, Chauhan SC, Andrianifahanana M, Moniaux N, Meza JL, Copin MC, van Seunigen J, Hollingsworth MA, Aubert JP, Batra SK (2006) Muc4 expression is regulated by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in pancreatic adenocarcinoma cells via transcriptional and post- translational mechanisms. *Oncogene* 26 (1):30-41
37. Strous GJ, Dekker J (1992) Mucin-type glycoproteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27: 57-92

38. Swartz MJ, Batra SK, Varshney GC, Hollingsworth MA, Yeo CJ, Cameron JL, Wilentz RE, Hruban RH, Argani P (2002) Muc4 expression increases progressively in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J clin Pathol*; 117 (5): 791-6
39. Thornton DJ, Khan N, Mehrotra R, Howard M, Veerman E, Packer NH, Sheehan JK (1999) Salivary mucin MG1 is comprised almost entirely of different glycosylated forms of the MUC5B gene product. *Glycobiology* 9: 293-302
40. Troxler RF, Iontcheva I, Oppenheim FG, Nunes DP, Offner GD (1997) Molecular characterization of a major high molecular weight mucin from human sublingual gland. *Glycobiology* 7: 965-973
41. Wickstrom C, Christersson C, Davies JR, Carlstedt I (2000) Macromolecular organization of saliva: identification of 'insoluble' MUC5B assemblies and non-mucin proteins in the gel phase. *Biochem J* 351 Pt 2:421-8.: 421-428
42. Williams RD (1980) Human urologic cancer cell lines. *Invest Urol.* 17(5): 359-63
43. Yin BW, Lloyd KO (2001) Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem* 276: 27371-27375
44. Zalewska A, Zwierz K, Zolkowski K, Gindzienski A (2000) Structure and biosynthesis of human salivary mucins. *Acta Biochim Pol* 47: 1067-1079

6. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Michael Stöckle aus der Klinik für Urologie der Uniklinik Homburg-Saar für die Überlassung des interessanten Themas dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn PD Dr. med. J. Lehmann, und Frau Dr. med. M. Retz, die mich während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit einzigartig unterstützt und mit besonderem Engagement gefördert haben.

Für die freundliche Einarbeitung in die wissenschaftliche Methoden und tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit danke ich den medizinisch technischen Assistenten Frau A. Grieger und Herrn J. Eggers aus dem urologischen Labor der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Ebenso möchte ich allen Mitarbeitern und Doktoranden des Labors für experimentelle Urologie danken für das ausgezeichnete Arbeitsklima und den freundschaftlichen Zusammenhalt während dieser Arbeit und darüber hinaus.

Ebenso bin ich meinem Direktor Herrn Prof. Dr. med. M. Schilling für seine unendliche Geduld bis zur Fertigstellung dieser Arbeit zu Dank verpflichtet.

An dieser Stelle danke ich meinen Eltern Farideh Hoshangi und Davood Shayesteh-Kheslat und meinem Ehemann Hamid Nawai, die mich stets mit aller Kraft während des Studiums, der Dissertation und der täglichen Arbeit unterstützt haben.

Abschließend sei den vielen ungenannten Patienten gedankt, die durch ihre vertrauensvolle Einwilligung in den sie betreffenden Anteil an der Untersuchung diese Arbeit erst ermöglichten.

7. Lebenslauf

Persönliche Daten:

| | |
|----------------------|-------------------------------|
| Name: | Shayesteh-Kheslat |
| Vorname: | Roushanak |
| Geburtsdatum / -ort: | 17.06.1975 in Tehran/ Iran |
| Anschrift: | Listerstraße 2, 66424 Homburg |
| Familienstand: | verheiratet |
| Staatsangehörigkeit: | deutsch-persisch |

Schulbildung:

| | |
|-----------|--|
| 1981-1986 | Grundschule in Tehran |
| 1986-1989 | Fridtjof- Nansen- Hauptschule in Kiel |
| 1989-1992 | Gustav- Friedrich- Meyer- Realschule in Kiel |
| Juni 1992 | Abschluß mit mittlerer Reife |
| 1992-1995 | Besuch des Max- Planck Gymnasiums in Kiel |
| Juni 1995 | Abschluß mit Allgemeiner Hochschulreife |

Hochschulbildung:

| | |
|---------|---|
| 10/1995 | Aufnahme des Studiums Humanmedizin an der Christian- Albrechts- Universität in Kiel |
| 08/1997 | Ärztliche Vorprüfung |
| 08/1998 | Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung |
| 08/2000 | Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung |

Famulaturen:

| | |
|-------------------|---|
| 03/1998 - 04/1998 | Fach: Gynäkologie St. Vinzenz Hospital in Mainz |
| 02/1999 - 03/1999 | Fach: Anästhesiologie und operative Intensivmedizin Christian-Albrechts-Universitätsklinik in Kiel |
| 08/1999 - 10/1999 | Fach: Urologie Christian-Albrechts-Universitätsklinik in Kiel |

Praktisches Jahr:

| | |
|-------------------|---|
| 10/2000 - 02/2001 | Fach: Urologie Universitätsklinik Homburg/ Saar |
| 02/2001- 06/2001 | Fach: Chirurgie Universitätsklinik Homburg/ Saar |
| 06/2001- 09/2001 | Fach: Innere Universitätsklinik Homburg/ Saar |

ÄIP/ Assistenzärztin

11/ 2001 - 05/ 2003

Fach: Allgemein-, Viszeral- Gefäß- und Kinderchirurgie
Prof. Dr. M. Schilling
Universitätsklinik des Saarlandes in Homburg

05/ 2003 – 10/ 2003

Rotation in die Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie
Prof. Dr. H.-J. Schäfers
Universitätsklinik des Saarlandes in Homburg

Seit 10/ 2003

Allgemein-, Viszeral- Gefäß- und Kinderchirurgie
Prof. Dr. M. Schilling und
Unfall und Wiederherstellungschirurgie
Prof. Dr. med. T. Pohlemann
Universitätsklinik des Saarlandes in Homburg